Thioredoxine aus der Grünalge Scenedesmus obliquus und die multiplen Funktionen von Thioredoxin in Enzymsystemen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

WOLFGANG WAGNER

aus Fulda

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Thioredoxine aus der Grünalge Scenedesmus obliquus und die multiplen Funktionen von Thioredoxin in Enzymsystemen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

WOLFGANG WAGNER

aus Fulda

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 18. 4. 1978

Tag der mündlichen Prüfung 3. 5. 1978

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Kindl

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Abkürzungen		
1.	Einleitung	1
1.1	Die Thioredoxine und ihre multiplen Funktionen	1
1.1.1	Thioredoxine in Ribonucleotidreduktion und DNA-Biosynthese	1
1.1.2	Regulation von Enzymaktivitäten	5
1.1.3	Assimilatorische Sulfatreduktion und Thioredoxine	7
1.2	Molekulare Struktur der Thioredoxine	8
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	10
2.	Experimenteller Teil	12
2.1	Allgemeine Verfahren, Bestimmungsmethoden, Reagenzien und Geräte	12
2.2	Pflanzenmaterial	12
2.2.1	Synchronisation von Scenedesmus obliquus	13
2.2.2	Batch-Kulturen	13
2.2.3	Heterotrophe Kulturen	15
2.3	Reinigung und Charakterisierung von Thioredoxin aus Scenedesmus obliquus	16
2.3.1	Aufschlußverfahren	16
2.3.2	Fällungsschritte	16
2.3.3	Chromatographie auf DEAE-Cellulose	17
2.3.4	Gelfiltration	18
2.3.5	Chromatographie auf CM-Cellulose; Gefriertrocknung	18
2.3.6	Elektrolytische Reduktion von Thioredoxin und Chromatographie auf "aktivierter Thiolsepharose 4B"	19
2.3.7	Gelelektrophorese und isoelektrische Fokussierung	20
2.3.8	Aminosäureanalyse	22
2.4	Thioredoxin-Bestimmung mit Ribonucleosid-diphosphatreduktase aus Escherichia coli	23

2.4.1 Enzympräparation 23
2.4.2 Enzymatischer Test auf Thioredoxin-Aktivität 24
2.4.3 Trennung und Auswertung durch Dünnschicht-chromatographie 25
2.5 Ribonucleotidreduktase in Scenedesmus obliquus 26
2.6 Versuche zum Nachweis einer Thioredoxin-reduktase in Scenedesmus obliquus 27
2.6.1 Photometrische Bestimmung freier SH-Gruppen mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) 27
2.6.2 Chromatographie auf 2',5'-ADP-Sepharose 4B 28
2.7 Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinat-chloroplasten 29
2.8 Bestimmung der PAPS-Sulfotransferase-Aktivität 30

3. Ergebnisse 31
3.1 Nachweis pflanzlicher Thioredoxine 31
3.1.1 Der Ribonucleotidreduktase-Test auf Thioredoxin-Aktivität 31
3.1.2 Reproduzierbarkeit der Meßwerte und Fehlerbetrachtung 33
3.2 Thioredoxin in Algenzellen 36
3.2.1 Thioredoxin-Aktivität in Extrakten aus synchronisierten Algen 37
3.2.2 Isolierung der Algen-Thioredoxine aus batch-Kulturen 40
3.2.3 Elektrolytische Reduktion von Thioredoxin zur Chromatographie auf aktivierter Thiol-sepharose und Bestimmung von SH-Gruppen 51
3.2.4 Molekulargewichtsbestimmung und weitere Charakterisierung der Thioredoxine aus Scenedesmus 55
3.2.5 Aminosäurezusammensetzung 59

3.2.6 Substrataktivität gegenüber den Ribonucleotidreduktasen aus E. coli und Scenedesmus 61
3.3 Versuche zum Nachweis von Thioredoxinreduktasen in Algen 65
3.3.1 NADPH-Abhängigkeit und Affinitätschromatographie 65
3.3.2 Abhängigkeit von reduziertem Ferredoxin 69
3.4 Aktivität der Scenedesmus Thioredoxine in weiteren Enzymreaktionen 71
3.4.1 Versuche zur Reaktion von Thioredoxin mit dem Glutathionsystem und mit Thioredoxinreduktase aus E. coli 71
3.4.2 Aktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinat 72
3.4.3 PAPS-Sulfotransferase aus Synechococcus 74
3.5 Austauschbarkeit bakterieller und pflanzlicher Thioredoxine 76

4. Diskussion 81
4.1 Nachweis von Thioredoxin in Scenedesmus obliquus 81
4.2 Isolierung und Charakterisierung von drei Proteinen mit Thioredoxin-Aktivität aus Scenedesmus 87
4.3 Multiple Funktionen von Thioredoxinen in Enzymsystemen 94
4.4 Kompartimentierung von Thioredoxinen 100

5. Zusammenfassung 102

Literaturverzeichnis 105

Abkürzungen

A_{280}-Einheiten	Menge, die in 1 ml gelöst, bei Schichtdicke d = 1 cm die Extinktion E = 1 (bei 280 nm) ergibt
ADP-Sepharose	Adenosin-2',5'-diphosphat über N^6 gebunden an Sepharose
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ARP_a, ARP_b	assimilation regulatory protein a bzw. b
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
c	Zählimpulse
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
Ci	Ci = 2,22 x 10^{12} dpm
CM-Cellulose	Carboxymethyl-Cellulose
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
cpm	Zählimpulse pro Minute
cps	Zählimpulse pro Sekunde
dCMP	Desoxycytidin-5'-monophosphat
DEAE-Cellulose	Diethylaminoethyl-Cellulose
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) oder 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoesäure ("Ellmanns Reagenz")
DTT	Dithiothreit
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
E_{280}	Extinktion bei 280 nm
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
g	Erdbeschleunigung
G-6-P-System	zusammengesetzt aus Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und NADP(H)
MG	Molekulargewicht
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
OD_{578}	optische Dichte bei 578 nm

PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
pcv	packed cell volume
PEI-Cellulose	Polyethylenimin-Cellulose
RRase	Ribonucleotidreduktase
TNB	"Thionitrobenzoat" (2-Nitro-5-mercapto-benzoesäure, Dianion)
TR	Thioredoxin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRRase	Thioredoxinreduktase
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546006_0021

1. Einleitung

1.1 Die Thioredoxine und ihre multiplen Funktionen

"Thioredoxin", ein thiolhaltiges Polypeptid mit Redoxfunktion, wurde erstmals von Reichard als Wasserstoffüberträger für die Ribonucleotidreduktase-Reaktion in Escherichia coli identifiziert [1,2]. Heute muß man diesen Begriff weiter fassen und damit eine ganze Gruppe von Proteinen bezeichnen, die sich in ihren Eigenschaften und multiplen Funktionen stark ähnlich sind.

Thioredoxine besitzen selbst keine enzymatische Aktivität, fungieren aber als (Co-)Substrate, Carrier (Akzeptoren) sowie als Untereinheiten und Aktivatoren von Enzymen. Ihre biologische Wirkung beruht auf einer Reihe von gemeinsamen Strukturmerkmalen, die als Kriterien zur Einordnung eines Proteins in die Klasse der Thioredoxine herangezogen werden. Sie sind kleine, hitzestabile Proteine vom Molgewicht 10 000 - 20 000, die mindestens zwei Cysteinreste im Molekül enthalten und bisher in Bakterien [1,3], Hefe [4], Bakteriophagen aus der T-Reihe [5,6], Säugerleber und Tumorzellen [7-9] gefunden und teilweise charakterisiert wurden. Erst in jüngster Zeit gelang der Nachweis von Thioredoxinen in Algen [10,11] und - auf ganz anderem Wege - in höheren Pflanzen [12-14]. Da sie in keine der klassischen Kategorien von Coenzymen oder Proteinen einzuordnen sind und keine zusammenfassende Darstellung existiert, seien die wesentlichen bekannten Daten vor der Besprechung der eigenen Arbeiten hier referiert.

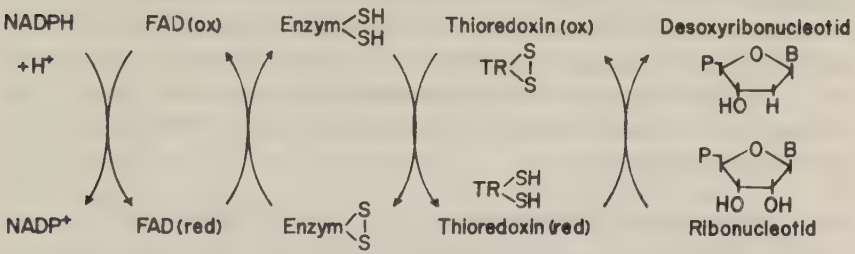
1.1.1 Thioredoxine in Ribonucleotidreduktion und DNA-Biosynthese

Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist der Träger der genetischen Information eines Organismus. Sie beinhaltet den verschlüsselten Bauplan jeder Zelle mit allen ihren Biosyntheseleistungen, Regulations- und Differenzierungsphänomenen. Bevor sich also ein Organismus durch Zell-

teilung vermehren kann, muß die DNA der Mutterzelle repliziert werden. Dieser Vorgang wird durch DNA-Polymerase katalysiert, die die monomeren Vorstufen der Desoxyribonucleinsäure zu einem identischen Abbild des parentalen Moleküls zusammenfügt. Diese Bausteine wiederum werden auf zwei Wegen bereitgestellt, dem "salvage pathway", der auf vorgeformte DNA-Bruchstücke zurückgreift, und in der de novo-Biosynthese, bei der die in der Zelle primär synthetisierten Ribonucleotide durch spezifische Reduktion zu Desoxyribonucleotiden umgesetzt werden [2]. Diese Reaktion katalysiert das Enzym Ribonucleotidreduktase (EC 1.17.4), die den benötigten Wasserstoff, der letztlich aus dem NADPH-Vorrat der Zelle entnommen wird, auf das Ribonucleotid überträgt [15]. Zur Verknüpfung zwischen NADPH und der Ribonucleotidreduktase dient ein weiteres Redoxsystem, das aus zwei Komponenten, dem Thioredoxin und der Thioredoxinreduktase (EC 1.6.4.5) besteht [1,16].

Alle bisher untersuchten Thioredoxine tragen in ihrer Aminosäurekette mindestens zwei Cysteinreste, die durch reversiblen Wechsel zwischen der Dithiol- und Disulfidform einen Wasserstofftransport ermöglichen. Das oxidierte Thioredoxin ($TR\text{-}S_2$) übernimmt mit Hilfe des Flavoenzyms Thioredoxinreduktase den Wasserstoff von NADPH und stellt in der reduzierten Form ($TR\text{-}(SH)_2$) den Wasserstoffdonor für die Reduktion eines Ribonucleotids an der Ribonucleotidreduktase dar. Oxidiertes Thioredoxin wird durch Thioredoxinreduktase und NADPH erneut reduziert usw.. Für das sehr gut erforschte reduzierende System in E. coli gilt nachstehender Weg als gesichert [17] (Abb. 1). Aus dieser Reaktionsfolge ist ersichtlich, daß Thioredoxin und die Thioredoxinreduktase in der Zelle nur in katalytischen Mengen vorhanden sein müssen.

Abb. 1: Reaktionsschema der Ribonucleotidreduktion



Während Ribonucleotidreduktasen typische induzierbare, je nach Wachstumsaktivität eines Gewebes in sehr unterschiedlicher Konzentration vorliegende Enzyme sind, wurden für die Thioredoxinreduktase aus normaler und regenerierender Rattenleber keine signifikanten Aktivitätsschwankungen festgestellt [18].

Untersuchungen zum Mechanismus der Thioredoxinreduktase aus E. coli zeigen, daß der Wasserstoff innerhalb des Proteins von NADPH zuerst auf ein Flavinnucleotid und von dort auf ein Disulfid im aktiven Zentrum übertragen wird. Die dabei gebildeten SH-Gruppen reduzieren anschließend die Disulfidbindung in Thioredoxin [19]. Dinucleotid-abhängige Thioredoxinreduktasen, aus Bakterien [16], Hefe [20], Säugerleber [18,21] und Tumoren [22] isoliert, deren Molekulargewichte je nach Organismus im Bereich von 55 000 - 75 000 liegen, akzeptieren nur NADPH als Elektronendonor und enthalten FAD als prosthetische Gruppe. Sie reagieren fast ausschließlich mit dem jeweiligen homologen Thioredoxin. Bislang sind nur zwei Ausnahmen mit eng begrenzter Austauschbarkeit bekannt: E. coli-Thioredoxinreduktase reduziert neben dem eigenen Thioredoxin auch das des T4-Phagen (der selbst keine Thioredoxinreduktase besitzt) [23], und die Thioredoxinreduktasen aus Säugerleber verwerten in vitro fremde Thioredoxine als Substrate [21,24]. Viel weniger spezifisch sind dagegen die Ribonucleotid-

reduktasen,[2,15] die nicht nur heterologe Thioredoxine akzeptieren, sondern auch reduzierte Liponsäure oder das unphysiologische Dithiol Dithiothreit. Diese Eigenart erlaubt die Identifizierung unbekannter Thioredoxine mit Hilfe der gut untersuchten Ribonucleotidreduktase aus E. coli die alle bisher gefundenen Thioredoxine außer denen der T-Phagen [5,6] - wenn auch mit unterschiedlicher Affinität - als Substrat verwendet.

Die Ribonucleotidreduktasen zahlreicher Organismen sind bereits beschrieben; zur Übersicht siehe Literaturstellen 2 und 15. Sie lassen sich in zwei verschiedene Gruppen einordnen:
Enzyme vom Typ I - repräsentiert durch das aus E. coli (EC 1.17.4.1) [25] - reduzieren stets die Diphosphate der Ribonucleoside. Für die Redoxreaktion brauchen sie kein Coenzym, wohl aber Eisenionen (Nicht-Häm-Eisen), die zur Stabilisierung eines Tyrosin-Radikals im aktiven Zentrum essentiell sind [26,27]. Ferner benötigen sie Magnesiumionen und Nucleotid-Effektoren, die sowohl die Umsatzgeschwindigkeit als auch die Affinität zum Substrat beeinflussen[28,29].

In Ribonucleotidreduktasen vom Typ II - am besten untersucht im Falle des Enzyms aus Lactobacillus leichmannii (EC 1.17.4.2) [30,31] - ist 5'-Desoxyadenosylcobalamin (Coenzym B_{12}) an der Wasserstoffübertragung beteiligt. Außerdem findet die Reduktion im Gegensatz zum Typ I meist an Nucleotiden der Triphosphatstufe statt. Beide Enzymtypen (deren Verbreitung unter Prokaryonten und Eukaryonten noch nicht ganz geklärt ist) unterscheiden sich nicht in ihrer Abhängigkeit von reduziertem Thioredoxin oder (in vitro) anderen Dithiolen.

Auf gänzlich andere Weise beteiligt sich E. coli-Thioredoxin nach Infektion des Bakteriums mit T7-Phagen an der DNA-Biosynthese. Es ließ sich zeigen, daß der Phage in einem E. coli-Stamm, auf dem er sich nicht vermehren kann, keine funktionsfähige DNA-Polymerase bildet, weil das E. coli-Thioredoxin als eine essentielle Unterein-

heit fehlt [32].

Die teilweise Phagen-codierte DNA-Polymerase ist bis jetzt das einzige belegte Beispiel für die Funktion von Thioredoxin als Untereinheit eines Enzyms. Intensive Untersuchungen der nicht infizierbaren, aber einem normalen Zellzyklus unterworfenen E. coli-Bakterien bewiesen ein absolutes Fehlen von Thioredoxin [33]. Die Isolation einer weiteren E. coli-Mutante, die keine Thioredoxinreduktase enthält [34], wirft die Frage nach dem Reaktionsweg der Ribonucleotidreduktion in diesen defizienten Stämmen auf. Neben dem Thioredoxin-Weg existiert offenbar ein zweiter, Glutathion-abhängiger Wasserstofftransport [33]. Reduktionsäquivalente werden von NADPH über die Glutathionreduktase (EC 1.6.4.2) auf Glutathion übertragen, das einen speziellen Carrier, "Glutaredoxin", nicht-enzymatisch reduziert, der seinerseits Substrat der Ribonucleotidreduktase ist. Welcher der beiden möglichen Stoffwechselwege im "Normalfall" zur Ribonucleotidreduktion führt, bleibt noch zu klären, da auch Glutathionmangelmutanten von E. coli bekannt sind, die über ausreichende Ribonucleotidreduktionskapazität verfügen [35].

1.1.2 Regulation von Enzymaktivitäten

Eine unerwartete Funktion für Thioredoxine wurde erst kürzlich bei der Regulation von pflanzlichen Enzymen gefunden. Im Licht assimilieren Chloroplasten CO_2 aus der Luft, das auf Ribulose-1,5-bisphosphat als Akzeptor übertragen wird. Durch die Reaktionen des Calvin-Zyklus (reduktiver Hexosephosphat-Pentosephosphat-Zyklus) muß der gebundene Kohlenstoff verarbeitet und der Akzeptor wieder regeneriert werden. Im Dunkeln dagegen lebt die Pflanze von ihrem gespeicherten Nährstoff und unterhält ständig einen "Pool" von Zwischenstufen des Calvin-Zyklus, die sie im oxidativen Hexosephosphat-Pentosephosphat-Zyklus synthetisiert. Beide Reaktionswege benützen trotz teilweise entgegengesetzter Funktion einige Enzyme gemeinsam. Um den Stoffwechsel auf Assimilation einzu-

stellen, werden daher im Licht die Schlüsselenzyme, die ausschließlich dem Calvin-Zyklus angehören, aktiviert. Bisher galt die lichtabhängige Erhöhung der Magnesiumkonzentration im Stroma als das dafür verantwortliche Regulationsprinzip [36].

Bei der Reinigung eines der Schlüsselenzyme des Calvin-Zyklus, der Fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) aus Spinatchloroplasten, fand man nun eine Ferredoxin-abhängige Aktivierung des Enzyms im Licht in Gegenwart von Chloroplastenpartikeln [12]. Der gleiche Effekt kann auch ohne Ferredoxin und/oder Licht durch das unphysiologische Reduktionsmittel Dithiothreit erreicht werden. Schließlich gelang die Trennung und Reinigung zweier Komponenten ("assimilation regulatory protein a" und "b", ARP_a und ARP_b), die für die Aktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase notwendig sind [37]. Sie wurden als Ferredoxin-abhängige Thioredoxinreduktase und Thioredoxin identifiziert [13], nachdem ARP_b (Molgewicht ca. 20 000) mit Ribonucleotidreduktase aus E. coli eine schwache, aber signifikante Reaktion zeigte und umgekehrt die Fructose-1,6-bisphosphatase durch E. coli-Thioredoxin aktiviert werden konnte [24]. Da alle Versuche mit Chloroplastenbruchstücken oder isolierten Enzymen durchgeführt wurden, bleibt die Frage nach der Relevanz dieses Regulationsmechanismus in vivo bislang unbeantwortet; ebenso ist der Vorgang der Desaktivierung im Dunkeln noch keineswegs geklärt und Gegenstand kontroverser Diskussionen [38].

Neben der Fructose-1,6-bisphosphatase werden in Chloroplasten höherer Pflanzen noch weitere Enzyme durch das Thioredoxin-System beeinflußt, nämlich Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase [39], NADP-Malatdehydrogenase [14,96], NADP-Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase und Ribulose-5-phosphatkinase [37]. Die Regulation einer Enzymaktivität

in tierischen Zellen durch Thioredoxin und NADPH-abhängige Thioredoxinreduktase wurde im Falle der Desoxycytidylatkinase (EC 2.7.4.14) aus Rattenleber beschrieben [40,41]. Ob es sich dabei um eine selektive Stimulation oder allgemeine Reduktion von Disulfidbindungen in Proteinmolekülen handelt, ist noch zu untersuchen [42,43]. Verschiedene Befunde legen nahe, daß das NADPH-abhängige Thioredoxin-System zumindest in Rattenleber mit der unspezifischen Proteindisulfidreduktase (EC 1.6.4.4) identisch ist [44]. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß die Thioredoxine aus Kalbsleber und E. coli Disulfidbrücken in Insulin bzw. Choriogonadotropin in vitro zu reduzieren vermögen, wobei es sich kaum um physiologisch sinnvolle Reaktionen handeln kann [7,45].

1.1.3 Assimilatorische Sulfatreduktion und Thioredoxine

Zur Synthese von Aminosäuren, Coenzymen und anderen biologisch wichtigen Molekülen ist jeder Organismus auf die Zufuhr von Schwefel angewiesen. Während für Tiere reduzierte Schwefelverbindungen, wie die Aminosäuren Methionin und Cystein als Nahrungsbestandteile unentbehrlich sind, existieren Pflanzen und Bakterien mit Sulfat als einziger Schwefelquelle, das in diesen Organismen bis auf die Stufe des Sulfids reduziert wird. Diese assimilatorische Sulfatreduktion ist in Hefe [46,47], Bakterien [48], Pflanzen [49,50] und Blaualgen [51] erforscht. Vor der Reaktion wird anorganisches Sulfat unter Energieverbrauch (ATP) in "aktives Sulfat", den Ausgangsstoff der Reduktion, umgesetzt. Von dieser Verbindung wird der Sulfatrest mit Hilfe der Sulfotransferase (EC 2.8.2.-) auf die Thiolgruppe eines geeigneten Carrier-Moleküls übertragen, um ein organisches Thiosulfat zu bilden. Gebunden an den Träger wird der Schwefel bis zur Stufe des Sulfids reduziert und letztlich zur Synthese von Cystein aus O-Acetylserin verwandt.

Heute kennt man zwei unterschiedliche Wege der Sulfatreduktion. Der erste ist in nicht-photosynthetisierenden Organismen (Hefe; E. coli und anderen Bakterien) ver-

wirklicht. Die aktivierte Sulfatverbindung wurde als 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) identifiziert, und die Reduktion des organischen Thiosulfates verläuft in NADPH-abhängiger Reaktion [48].

Photosynthetisierende Organismen (Pflanzen und Blaualgen) verwenden dagegen fast ausschließlich Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) - einige Blaualgen nur PAPS - als aktivierte Verbindung und liefern die Elektronen zur Reduktion des Sulfatrestes am Carrier direkt über Ferredoxin [48].

Frühe Publikationen über die Sulfatreduktion in Hefe beschreiben die Teilnahme von Thioredoxin und Thioredoxinreduktase, jedoch ohne Untersuchung der Einzelschritte [46]; spätere Arbeiten klärten dann die Details der eigentlichen Funktion des Thioredoxin-Systems auf [47]: In NADPH-abhängiger Reaktion wird ein niedermolekularer Carrier (Molgewicht 1400) durch das Thioredoxin-System reduziert, um eine SH-Gruppe zur Aufnahme des Sulfatmoleküls freizusetzen. Anders liegen die Verhältnisse bei E. coli. Hier gelang es, den Carrier selbst durch Vergleiche als das bekannte Thioredoxin zu identifizieren [48] und die Thiosulfat-Zwischenverbindung nachzuweisen. In Chlorella [52] fand man - ähnlich wie in Hefe - einen niedermolekularen Akzeptor (Molgewicht 1200). Die Beteiligung eines Thioredoxin-Systems an der Sulfatreduktion ist jedoch offenbar nicht erforderlich [48,53]. Ein weiterer Unterschied zu den oben beschriebenen Reduktionsmechanismen liegt darin, daß der in Chlorella vorhandene Cofaktor oder Carrier zur Reaktion nicht unbedingt notwendig ist; verschiedene Thiolverbindungen machen ihn zumindest in vitro überflüssig.

1.2 Molekulare Struktur der Thioredoxine

Zur molekularen Struktur der Thioredoxine liegen bislang nur begrenzte Informationen vor. Neben Aminosäuresequenzen der Phagen- [54], Hefe- [55] und E. coli-Thioredoxine [56] sind besonders die kristallographischen Daten zum räumlichen Aufbau des bakteriellen Moleküls interessant. Die Röntgen-

strukturanalyse mit einer Auflösung von 2.8 Å [57] zeigt fünf Stränge in Faltblattanordnung umgeben von vier Helixstücken. Die Aminosäuren Glycin und Prolin, die zusammen mit den beiden Cysteinresten den 14-gliedrigen Disulfidring des aktiven Zentrums bilden, liegen auf einer Ausstülpung, weswegen Thioredoxin als ein "männliches" Protein bezeichnet wird. Die Hitzestabilität und die nicht-kovalente Rekonstituierbarkeit des Moleküls aus Bruchstücken läßt sich mit der Fixierung von 75 % der Aminosäurereste in wohldefinierten Sekundärstrukturen erklären [58]. Daneben existieren zwei Regionen im Molekül, die über Protein-Protein-Wechselwirkung zur Dimerenbildung bei der Kristallisation führen. Es wird postuliert, daß diese Bereiche eine wesentliche Rolle bei der Anlagerung von E. coli-Thioredoxin an die T7-DNA-Polymerase-Untereinheit spielen (siehe Kapitel 1.1.1).

Die Molekülgrößen der in der Struktur genügend untersuchten Thioredoxine variieren von 87 bis ca. 120 Aminosäureresten (T4-Phage bzw. Hefe). Neben den zwei aktiven Cysteinresten können 2 oder 4 weitere Cysteine vorkommen (so im Leber- bzw. Novikoff-Tumor-Protein). Das für Chloroplasten-Thioredoxin berichtete wesentlich höhere Molgewicht (20 000 gegenüber normalerweise 12 000) bedarf wahrscheinlich der Korrektur (s. u.).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Zu Beginn der im folgenden geschilderten Experimente war, im Gegensatz zu Ribonucleotidreduktase [59-61], ein Thioredoxin aus Pflanzen noch nicht bekannt. Da die Synthese von Desoxyribonucleotiden nach den heutigen Kenntnissen in allen Organismen nach ähnlichem Schema abläuft, lag es nahe, auch in Pflanzen die Beteiligung des Thioredoxin-Systems an dieser Reduktionsreaktion zu vermuten. Frühere Untersuchungen mit Weizen- und Bohnenkeimen [62] brachten Hinweise auf die Existenz thioredoxinähnlicher Proteinfraktionen, konnten sie aber mangels eines spezifischen Tests nicht zweifelsfrei sichern. Da Thioredoxin, wie erwähnt, selbst keine Enzymaktivität besitzt, muß es i. a. "blind" (z. B. durch Hitzefraktionierung) aus Gewebeextrakten isoliert werden. In einfachen Fällen wie beim E. coli-Thioredoxin-System gelingt dann über die Reduktion von 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoesäure (DTNB) ein kolorimetrischer Nachweis, der jedoch bei den erwähnten Pflanzenextrakten völlig unbefriedigend ausfiel [62].

Ziel dieser Arbeit war, den Nachweis für die Verbreitung des Thioredoxin-Systems in Pflanzen mit Hilfe des spezifischen, aber ungleich aufwendigeren Ribonucleotidreduktase-Tests als Standardmethode zu erbringen. Als Ausgangsmaterial wurde die einzellige Süßwasser-Grünalge Scenedesmus obliquus gewählt, die leicht in ausreichenden Mengen kultivierbar ist und zudem unter geeigneten Bedingungen weitaus höhere Ribonucleotidreduktase-Aktivität enthält als andere untersuchte Pflanzen [59-61].

Während die Beteiligung der Thioredoxine an der enzymatischen Ribonucleotidreduktion (1.1.1) wohl universell gültig ist und in dieser Arbeit an einem neuen Beispiel bekräftigt wird, werfen die unter 1.1.2 und 1.1.3 beschriebenen Funktionen einzelner Proteine die Frage auf, ob es sich dort um spezielle oder evtl. auch nur allgemeine Thioredoxin-abhängige Reaktionen handelt. Zur Beurteilung dieser Frage sollte die Isolierung und Charakte-

risierung eines neuen pflanzlichen Thioredoxins ebenfalls beitragen helfen, da hierfür die Zahl der bisher untersuchten Systeme noch viel zu gering ist. Ein zweiter wesentlicher Aspekt meiner Arbeit entwickelte sich daher aus einer systematischen Überprüfung von verschiedenen Thioredoxinen auf ihre Austauschbarkeit in uns zugänglichen Enzymsystemen. Diese Studien geschahen teilweise in Abstimmung mit ganz anders angelegten Experimenten anderer Arbeitsgruppen. Als Ergebnis können wir erstmals eine sinnvolle Interpretation der Kreuzreaktivitäten aller Thioredoxine und ihrer zugehörigen Enzyme vorschlagen.

2. Experimenteller Teil

2.1 Allgemeine Verfahren, Bestimmungsmethoden, Reagenzien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien waren "p. a." oder "für biochemische Zwecke" und stammten ebenso wie käufliche Enzyme, Proteine und Substrate von Merck, Serva oder Boehringer. Zentrifugationen wurden in gekühlten Sorvall- und Beckman-Zentrifugen durchgeführt. Für säulenchromatographische Verfahren stand eine LKB-Ausrüstung, zusammengesetzt aus Peristaltik-Pumpe, Fraktionensammler, Durchflußphotozelle und Schreiber, zur Verfügung. Photometrische Messungen erfolgten an einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ 3 mit Schreiber oder einem Cary 15. Dünnschichtchromatographische Trennungen wurden auf Polyethylenimin-Cellulose-Platten mit Fluoreszenzindikator der Firma Schleicher & Schüll und ihre Auswertung auf einem Dünnschicht-Scanner (Berthold LB 2723) mit Integrator vorgenommen. Radioaktives [5-^{3}H]Cytidindiphosphat wurde von Amersham, England, DEAE-Cellulose (DE 32) von Whatman, CM-Cellulose von Serva und Sephadex-Gele sowie "aktivierte Thiolsepharose 4B" und 2',5'-ADP-Sepharose 4B von Pharmacia, Schweden, bezogen. Proteinkonzentrationen wurden nach Lowry et al.[63] mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt. Alle präparativen Arbeiten wurden bei 0-6°C durchgeführt, die pH-Werte der Puffer beziehen sich, wenn nicht anders vermerkt, auf die Temperatur bei ihrer Verwendung.

2.2 Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für diese Arbeiten wurde die einzellige Grünalge Scenedesmus obliquus, Wildtyp Stamm D3 aus der Sammlung von Prof. Dr. H. Senger, Fachbereich Biologie, Marburg, verwendet. Nach botanischer Klassifizierung gehört Scenedesmus, von dem es über 100 Species gibt, zu den Clorococcales und kommt sowohl im Süßwasser

als auch im Boden vor. Im autotrophen Wachstum (Licht und CO_2) vermehrt sich die Alge nur asexuell und setzt nach dem Aufplatzen der Mutterzelle acht Autosporen frei. Supplementiert man das Nährmedium mit Glucose und Hefe-Extrakt, dann steigt die Zahl der Nachkommen pro Teilungszyklus unter diesen heterotrophen Bedingungen (Luft, kein Licht) auf sechzehn an.

2.2.1 Synchronisation von Scenedesmus obliquus

Axenische Algenkulturen wachsen in einem Lichtthermostaten (Fa. F. Kniese, Marburg) in anorganischem Nährmedium [64,65] (Tab. 1) unter Begasung mit CO_2-angereicherter Luft (3 % CO_2) bei 28°C [66]. Zur Synchronisation werden sie einem periodischen Licht-Dunkel-Wechsel von 14:10 Stunden unterworfen ($2 \cdot 10^4$ Lux) und zu Beginn jeder Lichtphase automatisch mittels eines über eine Photozelle gesteuerten Magnetventils mit frischem Nährmedium auf eine definierte Zelldichte verdünnt. Im künstlich auf 24 Stunden eingestellten Zellzyklus fällt die DNA-Biosynthese-Phase auf die 10.-16. Stunde. In dieser Zeit steigt die Aktivität von Ribonucleotid-reduktase vorübergehend steil an. Anschließend sporuliert die Alge während der 16.-20. Stunde. Nach mehreren Licht-Dunkel-Durchgängen verlaufen DNA-Biosynthese und Teilung weitgehend synchron [60].

2.2.2 Batch-Kulturen

Größere Mengen des Algenmaterials erhält man durch Anzucht von Scenedesmus obliquus in batch-Kulturen. Bei Raumtemperatur (23°C) werden sie in großen Röhren (je 700 ml anorganisches Nährmedium) unter Begasung mit Luft und CO_2 einem Dauerlicht von 12 000 Lux ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen stoffwechseln die Algen unabhängig voneinander, bis das Nährstoffangebot erschöpft oder die Lichtausbeute jeder Zelle bei steigender Populationsdichte limitierend wird.

Tabelle 1: Nährmedium für Scenedesmus [64,65]

	Konzentr. i. Medium	Konzentrat
Stammlösung I:		
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	$1 \cdot 10^{-4}$ M	1,5 g/l
KNO_3	$8 \cdot 10^{-3}$ M	80,9 g/l
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	$1 \cdot 10^{-3}$ M	24,6 g/l
NaCl	$8 \cdot 10^{-3}$ M	47,0 g/l
Stammlösung II:		
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	$1 \cdot 10^{-3}$ M	17,8 g/l
$NaH_2PO_4 \cdot 1\ H_2O$	$3 \cdot 10^{-3}$ M	40,5 g/l
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot H_2O$	$7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,4 g/l
Na-Citrat $\cdot$ 2 H_2O	$5,5 \cdot 10^{-4}$ M	16,5 g/l
Spurenelemente:		
H_3BO_3	$4,5 \cdot 10^{-5}$ M	2,86 g/l
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	$8 \cdot 10^{-6}$ M	1,81 g/l
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	$7 \cdot 10^{-7}$ M	0,222 g/l
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	$3 \cdot 10^{-7}$ M	0,079 g/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	$1 \cdot 10^{-7}$ M	0,0242 g/l

Für das Nährmedium verdünnt man je 10 ml der Stammlösungen I und II sowie 1 ml Spurenelement-Lösung auf 1 Liter.

2.2.3 Heterotrophe Kulturen

Für Experimente mit unbelichteten Algen wurde Scenedesmus obliquus in heterotropher Kultur gezüchtet. Im Dunkelinkubator wächst die Alge in einem mit Glucose (0,5 %) und Hefe-Extrakt (0,25 %) [67] angereicherten anorganischen Medium bei 30°C. Die Zellsuspensionen werden durch leichtes Schütteln in Erlenmeyerkolben belüftet.

Je nach den Kulturbedingungen sind die Zeiten der Ernte sowohl in Bezug auf den Zellzyklus als auch die absolute Wachstumsdauer verschieden zu wählen.

a) Synchrone Algen: Die Ernte erfolgt 12 Stunden nach der letzten Verdünnung bei einer Zelldichte von 1,5 µl pcv/ml Kultur (packed cell volume, bestimmt in Hämatokrit-Röhrchen, 5 min 1300 g). In dieser Zeit enthält die Alge maximale Ribonucleotidreduktase-Aktivität [60].

b) Batch-Kultur: 85 Stunden nach dem Animpfen der Röhren mit je 30 ml einer Algensuspension von 5 µl pcv/ml wird diese Zelldichte wieder erreicht, so daß bei der Ernte die nächsten Kulturen aus den vorhergehenden inokuliert werden können.

c) Heterotrophe Kultur: Nach dreitägigem Wachstum erreichen die Algen bei der Ernte eine Zelldichte von 10,5 µl/ml.

Die Zellen werden abzentrifugiert (5 min 1000 g), dreimal mit Aufschlußpuffer gewaschen und erneut bei niedriger Tourenzahl sedimentiert, sofort aufgearbeitet oder bei -80°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

2.3 Reinigung und Charakterisierung von Thioredoxin aus Scenedesmus obliquus

2.3.1 Aufschlußverfahren

Zur Aufarbeitung werden die Algen in Tris-HCl-Puffer (0,05 M, pH 7,85; 5 mM Mercaptoethanol) suspendiert und in einer Vibrogen-Zellmühle (Firma E. Bühler, Tübingen-Weilheim) mit Glaskugeln von 0,7 mm Durchmesser aufgebrochen [68]. Unter Kühlung mit Eiswasser schüttelt man die Zellen viermal fünf Minuten lang (2 Minuten Pause) bei voller Leistung des Gerätes (3500 UpM). Die Glasperlen werden durch Absaugen des Aufschlußgutes über eine D2-Glasfritte vom Rohhomogenat abgetrennt. Durch mehrfaches Waschen sind sie von anhaftenden Algenresten zu befreien. Bei der nachfolgenden Zentrifugation (20 000 g, GSA-Rotor) sedimentieren Zelltrümmer und Glasabrieb innerhalb von 20 min. Für Testzwecke wird nur der klare grüne Überstand (Rohextrakt) verwendet, zur Reinigung von Thioredoxin über weitere Stufen aber auch das zähflüssige, dunkelgrüne Material über dem Niederschlag.

2.3.2 Fällungsschritte

Den Rohextrakt versetzt man tropfenweise, unter ständigem Rühren mit einem Viertel seines Volumens an 4 %iger Streptomycinsulfatlösung bis zu einer Endkonzentration von 0,8 %. Nach 30 min wird ein gut sedimentierender Niederschlag durch Zentrifugation (20 min, 20 000 g) vom Überstand abgetrennt und verworfen.

In der klaren Lösung wird der pH-Wert mit kalter 1 N Essigsäure vorsichtig, unter guter Durchmischung auf pH 4,3 eingestellt. Der flockige Niederschlag muß sofort, innerhalb von 5 min bei 20 000 g abzentrifugiert werden. Die Neutralisation des Überstandes erfolgt mit 1 N Ammoniaklösung.

Zur Hitzedenaturierung erwärmt man die Proteinlösung schnell auf 60°C und hält diese Temperatur unter Rühren für 5 min konstant. Nach dem Abkühlen im Eisbad wird zentrifugiert (20 min, 20 000 g) und der Überstand durch Glaswolle filtriert.

Um die Proteine des Überstandes auszufällen, versetzt man die Lösung schrittweise mit 0,680 g Ammoniumsulfat pro ml Extrakt. Der pH-Wert ist dabei mit konzentrierter Ammoniaklösung im Bereich von 7,0-7,5 zu halten. Nachdem 95 %ige Sättigung erreicht ist, bleibt die trübe Suspension noch 4 Stunden in der Kälte stehen, bevor der Niederschlag abzentrifugiert wird (20 min, 20 000 g). Man löst das Sediment danach im kleinstmöglichen Volumen von Ammoniumacetat-Puffer (20 mM, pH 8,65; 5 mM Mercaptoethanol). Nach dem Entfernen geringer Mengen unlöslicher Substanz durch Zentrifugation (5 min, 30 000 g) wird das Proteinkonzentrat auf eine Sephadex G-25-Säule nach der Technik des Unterschichtens aufgetragen. Diese Säule (5,2 x 26,5 cm) ist zuvor mit Ammoniumacetat-Puffer der angegebenen Konzentration äquilibriert worden, in dem nun auch die Entsalzung durchgeführt wird. Alle 15 min fängt man Fraktionen von 11 ml auf.

2.3.3 Chromatographie auf DEAE-Cellulose

DEAE-Cellulose wird mit 1 M Ammoniumacetat, pH 8,65, 5 mM Mercaptoethanol vorbehandelt und in einer Säule (2,8 x 7,0 cm) sorgfältig mit dem gleichen Puffer der Konzentration 20 mM äquilibriert. Die proteinhaltigen Fraktionen nach der Gelfiltration auf Sephadex G-25 werden kombiniert und auf die DEAE-Cellulose aufgetragen. Nicht gebundene Proteine wäscht man mit 33 ml des Acetatpuffers von der Säule und schließt dann einen linearen Gradienten von 20 bis 250 mM Ammoniumacetat (je 140 ml), pH 8,65 mit 5 mM Mercaptoethanol an. Drei Fraktionen von je 11 ml werden pro Stunde eluiert.

Nach Durchlauf des Gradienten wird das Säulenmaterial mit 1 M Ammoniumacetat, pH 8,65 mit 5 mM Mercaptoethanol gewaschen.

2.3.4 Gelfiltration

Gradientenfraktionen von DEAE-Cellulose, in denen Thioredoxinaktivität meßbar ist (Hauptpeak), werden gemeinsam gegen gesättigte, neutralisierte Ammoniumsulfatlösung dialysiert. Nach 12 Stunden wird der Niederschlag abzentrifugiert, in 1-2 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,85, 5 mM Mercaptoethanol gelöst, der zusätzlich Dithiothreit (5 mM) enthält. Nach 60 min Inkubation bei 4°C gewinnt man durch Zentrifugation einen völlig klaren Überstand, der auf eine Sephadex G-50-Säule (2,8 x 84,0 cm) - äquilibriert mit Tris-HCl - zwischen Puffer und Gelbett geschichtet wird. Bei der Elution mit konstanter Geschwindigkeit von 16,4 ml/h fängt man Fraktionen von 5,5 ml/20 min auf. Die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration auf einer Sephadex G-75-Säule (53,0 x 2,0 cm), die mit Proteinen bekannter Größe kalibriert ist, wird mit 2,2 ml-Fraktionen/15 min durchgeführt.

2.3.5 Chromatographie auf CM-Cellulose; Gefriertrocknung

Thioredoxinhaltige Proben der Sephadex-Gelfiltration werden vereinigt und 16 Stunden gegen 10 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,05 mit 5 mM Mercaptoethanol dialysiert, mit 5 mM Dithiothreit reduziert und anschließend auf eine mit demselben Puffer vorbehandelte CM-Cellulose-Säule (1,8 x 2,0 cm) aufgetragen. Nach 15 minütigem Spülen mit dem Startpuffer wird die Säule durch einen linearen Salzgradienten von 10-100 mM Natriumacetat (je 100 ml), pH 5,05 mit 5 mM Mercaptoethanol eluiert. Pro Stunde erhält man so 4 Fraktionen zu 5,4 ml.

Das Eluat von CM-Cellulose mit Thioredoxin-Aktivität wird zweimal 12 Stunden lang gegen je 4 l 0,5 %ige Ammoniumhydrogencarbonatlösung dialysiert und im Vakuum 48 Stunden lyophilisiert, wobei sich auch das Salz der Probe verflüchtigt.

2.3.6 Elektrolytische Reduktion von Thioredoxin und Chromatographie auf "aktivierter Thiolsepharose 4B"

Nach Weitzman [77] werden Protein-Disulfidbrücken elektrolytisch an einer Quecksilberkathode reduziert. Die Apparatur besteht aus zwei Glasgefäßen, die über eine Salzbrücke (2 % Agar in gesättigter KCl-Lösung) miteinander verbunden sind und Anoden- bzw. Kathodenraum darstellen. Der Boden des Kathodengefäßes (5 ml Inhalt) ist mit Quecksilber bedeckt, das über einen abgedichteten Seitenarm durch einen Platindraht direkt mit der Spannungsquelle verbunden ist. Ein durchbohrter Gummistopfen, durch den die Salzbrücke sowie Kanülen zum Begasen mit Stickstoff und Entlüften geführt werden, verschließt das Reduktionsgefäß. Im Anodenraum taucht ein Platindraht als Elektrode in gesättigte KCl-Lösung. Die zu reduzierende Probe wird in 0,05 M Acetatpuffer, pH 4,5 auf die Kathode gebracht und unter Rühren mit Stickstoff begast. Es ist darauf zu achten, daß die Salzbrücke an beiden Enden guten Kontakt mit den Elektrolyten hat. Während der Reduktion (1,1 mA bei 4,5 V) werden in Abständen Proben gezogen und photometrisch auf ihren SH-Gehalt analysiert (siehe 2.6.1). Diese Technik diente zur Reduktion von Thioredoxin beim Versuch einer Affinitätschromatographie, in der Dithiothreit gestört hätte. Nach Abschluß der Reaktion (Dauer ca. 1 Stunde) entfernt man die Lösung aus dem Kathodenraum und trägt sie auf eine Thiolsepharose-Säule (0,8 x 9,0 cm) auf [78], die mit 0,3 M NaCl und 1 mM EDTA in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 äquilibriert und mit dem gleichen Puffer von pH 9,0 überschichtet ist (2 ml). Die reduzierte Probe in saurem

Puffer wird mit dem Überstand des Gelbettes gemischt und mit 8,6 ml/h chromatographiert. Nachdem die Extinktion im Eluat bei 343 nm auf Null abgefallen ist, löst man die gebundenen Proteine mit 2 ml 25 mM Cystein in Tris/NaCl/EDTA-Puffer (pH 8,0) ab, wäscht gründlich mit Puffer nach und reduziert das Affinitätsgel mit 20 mM Dithiothreit in diesem Puffer. Die Eluate der Säule werden mit Ribonucleotidreduktase aus E. coli auf ihre Thioredoxin-Aktivität getestet (2.4.2). Nach dem Gebrauch wird das Affinitätsgel durch Waschen mit 1 M NaCl, 0,5 M $NaHCO_3$ und Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 (alle mit 0,3 M NaCl und 1 mM EDTA), Aktivieren mit 2,2'-Dipyridyldisulfid (1,5 mM in Tris/NaCl/EDTA-Puffer) und nachfolgendem Waschen regeneriert [78].

2.3.7 Gelelektrophorese und isoelektrische Fokussierung

Zur Reinheitskontrolle wurde eine analytische diskontinuierliche Gelelektrophorese auf 7,5 %igen Polyacrylamidgelen durchgeführt.

Vorbereitung für die Elektrophorese [88]

A Trenngel: Anteile pro 100 ml Lösung

1) 1 N HCl	48,0 ml	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	36,6 g	pH 8,9
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	0,23 ml	
2) Acrylamid	30,0 g	
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,8 g	
3) Ammoniumpersulfat	0,14 g	

Man mischt 1 Teil von Nr. 1
2 Teile von Nr. 2
1 Teil Wasser
4 Teile von Nr. 3,

entlüftet im Vakuum und füllt die Lösung in die vorbereiteten Glasröhrchen. Zum Aufbringen der Probe setzt man einen Verdünnungspuffer aus

48 ml 2 N HCl
11,96 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
5 g Saccharose
250 µl 1 %ige Bromphenolblau-Lösung
im Endvolumen von 100 ml an.

Für getrocknete Proteine wird dieser Puffer 1:1 verdünnt, gelösten Proben wird das gleiche Volumen des konzentrierten Puffers zugesetzt. Auf jedes Röhrchen trägt man 50 µl der Substanzlösung auf, die gleichzeitig das Proben- und das Konzentrierungsgel ersetzt.

Als Elektrodenpuffer findet eine Lösung aus
0,6 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und
2,88 g Glycin auf 1 l Endvolumen mit pH 8,3 Verwendung.
In der gekühlten (2°C) Elektrophoreseapparatur (WTW Wiss.-Techn. Werkstätten) fokussieren die Proben bei pH 8,3 mit 1 mA pro Gelröhrchen bei 150 V, bis sich der blaue Farbstoff in einer hauchdünnen Zone konzentriert hat. Danach steigert man die Stromstärke auf 2 mA pro Gel und läßt die Probe bei pH 9,5 durch das Trenngel zur Anode (unten) wandern.

In einem Gemisch aus
0,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250
60 g Trichloressigsäure
70 ml Eisessig und
200 ml Methanol in 1 l Endvolumen
wird das Protein gefärbt (4 Stunden), und das Gel in einer Lösung aus Methanol, Eisessig und Wasser (2:3:15, V/V/V) wieder entfärbt (22 Stunden).

Der isoelektrische Punkt (pH-Wert, an dem ein Protein nach außen ungeladen erscheint) wird in einer isoelektrischen Fokussierung auf fertigen Polyacrylamid-Platten, die mit Ampholine Trägerampholyten dotiert sind, bestimmt [89]. Eine Ampholine PAGplate (LKB), die den pH-Bereich von 3,5-9,5 überstreicht, wird auf eine gekühlte (2°C) Elektrophoreseapparatur (Shandon-Labortechnik) gelegt und über elektrolytgetränkte Filterpapierstreifen mit den Elektroden

verbunden. Die Kathode befindet sich in 1 M NaOH, die Anode in 1 M H_3PO_4. Auf kleinen Filterpapierstücken werden die Proben (je 20 µl, etwa 20 µg Protein) auf das Gel gebracht und bei 300 V und 8 W baut sich ein pH-Gradient auf, in dem die Proteine so lange wandern, bis sie in dem pH-Bereich angekommen sind, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Nach einer halben Stunde sind die Probenblättchen zu entfernen, nach weiteren 30 min wird der pH-Gradient im Gel mit Hilfe einer Oberflächenglaselektrode ausgemessen und anschließend nochmals 20 min fokussiert. Als Referenzprobe dient Cytochrom c, dessen isoelektrischer Punkt von 10 bekannt ist [97]. Nach der Trennung wird die Gelplatte fixiert, angefärbt und entfärbt.

Fixierer	150 ml	Methanol
	350 ml	Wasser
	17,25 g	Sulfosalicylsäure
	57,50 g	Trichloressigsäure
Färber	0,115 g	Coomassie Brilliant Blue R-250 in 100 ml Entfärber gelöst
Entfärber	500 ml	Ethanol
	160 ml	Eisessig
		mit Wasser auf 2 l aufgefüllt.

Aus dem gemessenen pH-Gradienten und der Lage der gefärbten Proteinbanden kann man deren isoelektrische Punkte ermitteln.

2.3.8 Aminosäureanalyse

Mit Hilfe einer Aminosäureanalyse konnte die Zusammensetzung der isolierten Proteine bestimmt werden. Reine Proteinproben wurden gegen 0,5 %ige Ammoniumhydrogencarbonatlösung dialysiert, gefriergetrocknet und 6 Stunden bei 69°C (siedendes n-Hexan) in der Trockenpistole einem Ölpumpen-Vakuum ausgesetzt, um restliche Spuren von Ammoniumsalzen zu entfernen. Da bei Thioredoxinen der Cysteingehalt besonders interessant ist, oxidierte man sowohl Cystein- als auch Cystinreste im Protein mit

Perameisensäure zu Cystein-Sulfonsäure [98]. Dazu wurden 100 µg Thioredoxin in 12,5 µl Ameisensäure gelöst, mit 2,5 µl Methanol versetzt und 30 min bei -5°C gekühlt. Nach Zusatz von 25 µl Perameisensäure (s. u.) lief die Oxidationsreaktion bei -5°C innerhalb von 150 min ab. Die mit 1 ml Wasser verdünnte Probe wurde anschließend lyophilisiert. Die Perameisensäure wurde aus 95 Teilen 99 %iger Ameisensäure und 5 Teilen 30 %igem Wasserstoffperoxid hergestellt, 2 Stunden bei 25°C aufbewahrt und 30 min bei -5°C vorgekühlt. Die Hydrolyse der Proben - sowohl nativ als auch nach Oxidation - und die Mikroaminosäureanalyse führte freundlicherweise Dr. Y. Samejima im Pharmakologischen Institut der Universität Gießen mit einem Biotronik LC 6000-Aminosäureanalysator durch. Die Genauigkeit der Analyse oxidierter Proteine wurde anhand zweier Proben von Ribonuclease A und α-Chymotrypsin (beide vom Rind), deren Aminosäurezusammensetzung bekannt ist, überprüft.

2.4 Thioredoxin-Bestimmung mit Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Escherichia coli

2.4.1 Enzympräparation

Zur Präparation von Ribonucleotidreduktase aus E. coli wurde die Thyminmangelmutante E. coli B 3 (ATCC 23851) nach publizierten Vorschriften [72] kultiviert. Der erforderliche Großansatz konnte im Institut der Gesellschaft für Biotechnologie, Braunschweig-Stöckheim, durchgeführt werden. Nach Vorkulturen auf Schrägagar, in 4 l-Schüttelkulturen sowie im 200 l-Fermenter wuchsen die Bakterien in 3000 l Davis'-Minimalmedium mit Spurenelementen und Thymin-Zusatz. Bei pH 7,2 und 37°C erreichten die Zellen nach 7,5 Stunden eine Dichte von OD_{578} = 2,32, wurden nach Abkühlung auf 20°C in einer Durchflußzentrifuge innerhalb von 6 Stunden abzentrifugiert und in Portionen eingefroren.

2 kg der Zellmasse wurden in 3 l Puffer (50 mM Tris-HCl, 0,5 mM Mercaptoethanol, pH 8,5) suspendiert und in einem Manton-Gaulin-Homogenisator in zweimaligem Durchgang aufgeschlossen und zentrifugiert. In den Überstand wurde eine 10 %ige Streptomycinsulfatlösung eingerührt, bis eine Endkonzentration von 0,9 % erreicht war. Nach Abtrennung des Niederschlages wurde mit 1 N Essigsäure ein pH-Wert von 4,6 eingestellt, das gefällte Material schnellstmöglich abzentrifugiert, in Tris-HCl-Puffer 0,05 M, pH 8,0 mit 1 mM Dithiothreit aufgenommen und mit Ammoniaklösung neutralisiert. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proteinlösungen auf das sechsfache Volumen verdünnt und auf einer DEAE-Cellulose-Säule (6 x 23 cm) chromatographiert. Ein Gradient von 0,1-0,5 M Kaliumphosphat, pH 7,0 mit 1 mM DTT eluierte die Ribonucleotidreduktase in einer Reinheit, die für viele Versuche zur Ribonucleotidreduktion ausreichte. Unter Standardbedingungen setzt 1 mg dieser Präparation (nicht stimuliert) in 30 min 2 nMol CDP um. Weitere Reinigungsschritte auf DEAE-Cellulose und Hydroxylapatit bis zur Trennung des Enzyms in seine Untereinheiten B1 und B2 führten W. Ludwig und G. Schimpff durch [31].

2.4.2 Enzymatischer Test auf Thioredoxin-Aktivität

Zur Bestimmung der Thioredoxin-Aktivität in Abwesenheit von Thioredoxinreduktase wird der Test mit E. coli-Ribonucleotidreduktase und DTT verwendet. Bei geringer DTT-Konzentration stimuliert ein Zusatz von Thioredoxin die Reduktase-Reaktion proportional der Thioredoxin-Menge [72]. Das Testgemisch enthält im Endvolumen von 0,3 ml Tris-Puffer (pH 7,5, 22°C):

10 µCi [5-^{3}H]CDP, verdünnt auf eine spezifische Aktivität von 0,23 Ci/mMol (Gesamtsubstrat 43,2 nMol im Test)
2 mM DTT
15 mM Magnesiumacetat
0,8 mM EDTA und
0,115 mM dTTP als Effektor sowie
24 µg E. coli-Ribonucleotidreduktase (4 µg B1 und 20 µg B2; nicht-stimulierter Umsatz 200 nMol CDP/mg Protein in 30 min)

Thioredoxinhaltige Proben werden in Mengen bis zu 0,15 ml in Tris-HCl-Puffer (pH 7,85) zugesetzt. Abweichungen von diesem Standardansatz werden besonders vermerkt.

In Inkubationsröhrchen wird zuerst die radioaktive Substratlösung pipettiert und unter Vakuum bei Zimmertemperatur zur Trockne eingeengt. Danach gibt man Effektoren, Salze und Reduktionsmittel sowie die Thioredoxin-Probe zu. Zuletzt wird die Reaktion mit Enzym gestartet. Das Gemisch inkubiert man 30 min bei 30°C, stoppt dann die Reaktion nach Zusatz von je 0,25 µMol CMP und dCMP als Carrier mit 1 ml 1 M $HClO_4$, zentrifugiert denaturiertes Protein ab und hydrolysiert den Überstand 15 min im kochenden Wasserbad. Dadurch werden Cytidin- und Desoxycytidinnucleotide zu den Monophosphaten abgebaut. Bei der Neutralisation der erkalteten Lösung mit 4 N KOH (gegen Phenolrotindikator) fällt $KClO_4$ aus. Man läßt die Proben 1 Stunde im Eisbad stehen, zentrifugiert das Salz ab und engt den Überstand am Rotationsverdampfer (Wasserbad 40-50°C) bis zur Trockne ein.

2.4.3 Trennung und Auswertung durch Dünnschichtchromatographie

Polyethylenimin-Cellulose-Dünnschichtplatten (20 x 20 cm) werden wie folgt vorbereitet [73,74]. In Laufrichtung wird beidseitig ein etwa 5 mm breiter Rand von PEI-Cellulose befreit, um beim Entwickeln der Platte eine gerade Front zu erhalten. Zusätzlich kratzt man mit einer Nadel parallele Rillen von 2 cm Länge im Abstand von 5 mm unterhalb der Startlinie in die Schicht. Zwei Vorläufe sind notwendig, um die Platten zu aktivieren:

1. Lauf: 5 cm aufsteigend in 10 % NaCl-Lösung, danach sofort bis zum Ende in Wasser; Platten trocknen in kaltem Luftstrom.

2. Lauf: in Wasser.

Nachdem die Platten im Dunkeln gut getrocknet sind, können sie verwendet werden. Der Rückstand der Testproben wird in 50 µl Wasser aufgenommen und 3 cm vom unteren Rand entfernt in 2 cm breiten Streifen auf die Startlinie aufge-

tragen (ca. 5 µl). Zur Trennung der Nucleotide chromatographiert man die Reaktionsprodukte im Laufmittel nach Schrecker [75]: 1 M LiCl gesättigt mit Borsäure: Ethanol (destilliert) 1:1 (V/V), Laufzeit ca. 6 Stunden. Auf den getrockneten Platten lassen sich CMP und dCMP im kurzwelligen UV lokalisieren.

Um den Umsatz der Reduktase-Reaktion bestimmen zu können, ist es notwendig, die Menge des gebildeten radioaktiven dCMP zur Summe aller radioaktiven Substanzen auf der Platte ins Verhältnis zu setzen. Dies läßt sich am einfachsten durch Auswertung der Radioaktivitätsverteilung mittels eines Dünnschichtscanners (Berthold BF Modell LB 2723) mit Integrator durchführen. Nach Abzug der Nullinie summiert man alle Impulse der getrennten Peaks und berechnet das Verhältnis der Impulse von dCMP zu der Gesamtzahl. Aus dem so erhaltenen prozentualen Umsatz kann man in Kenntnis der Ausgangsmenge von radioaktivem und nicht-markiertem Substrat die Aktivität der Ribonucleotidreduktase in nMol umgesetztem CDP/30 min errechnen, ohne die Zählausbeute der Radioaktivitätsmessung (ca. 1-2 %) [81] oder die genaue Menge der auf die Platten aufgetragenen Probe berücksichtigen zu müssen. Die Reproduzierbarkeit dieser Methode wird in 3.1.2 besprochen.

2.5 Ribonucleotidreduktase in Scenedesmus obliquus

Als Ausgangsmaterial zur Aufarbeitung von Ribonucleotidreduktase aus Scenedesmus benötigt man synchronisierte Algen [60]. Das Aufschlußverfahren und die Streptomycinsulfatfällung werden wie oben beschrieben (2.3. 1-2) durchgeführt. Ribonucleotidreduktase läßt sich durch Dialyse des erhaltenen Überstandes gegen 40 %ige Ammoniumsulfatlösung (4 Stunden) präzipitieren und abzentrifugieren (20 min, 25 000 g). Erneute Dialyse des 40 %-Überstandes gegen 80 %ige Ammoniumsulfatlösung fällt eine zweite thioredoxinhaltige Proteinfraktion aus, die in der Zentrifuge abgetrennt und weiter verarbeitet wird,

während die verbleibende Lösung zu verwerfen ist.

Zum Entfernen mitgerissener Salze dialysiert man beide Proteinfraktionen gegen einen geeigneten Puffer, dessen Zusammensetzung von der Problemstellung nachfolgender Experimente abhängt.

Die Testbedingungen gleichen in wesentlichen Teilen denen von Experimenten mit E. coli-Ribonucleotidreduktase (2.4.2). Nach W. Feller [60] sind folgende Konzentrationen in 300 µl Endvolumen einzustellen:

10 µCi [5-^{3}H]Cytidindiphosphat (spez. Aktivität 19 Ci/mMol)
2 mM Dithiothreit
3,5 mM ATP
5 mM Mg^{2+}
je 0,03 mM Fe^{2+}/Fe^{3+}

Inkubationszeit: 1 Stunde bei 30°C.

2.6 Versuche zum Nachweis einer Thioredoxinreduktase in Scenedesmus obliquus

2.6.1 Photometrische Bestimmung freier SH-Gruppen mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)

Zum Nachweis der Enzymaktivität einer NADPH-abhängigen Thioredoxinreduktase (TRRase) dient die Reaktion gemäß Gleichung 1 in Gegenwart eines Überschusses von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) - abgekürzt DTNB [2,16].

$$TR\text{-}S_2 + NADPH + H^+ \xrightleftharpoons[\text{reduktase}]{\text{Thioredoxin-}} TR\text{-}(SH)_2 + NADP^+ \quad \text{(Gl. 1)}$$

Reduziertes Thioredoxin, TR-$(SH)_2$, reagiert mit DTNB (Ellmans Reagenz) [71] unter Bildung des gelben Reduktionsproduktes (Thiophenolat), dessen Konzentrationsanstieg bei 412 nm gemessen wird. Hierzu benötigt man also außer der auf Enzymaktivität zu testenden Proteinlösung Thioredoxin des gleichen Organismus; in der Praxis werden z. B. eine hitzestabile Proteinfraktion (TR) und eine Ammoniumsulfatfraktion größerer Proteine bzw. Säuleneluat (TRRase) gemeinsam getestet. Neben wechselnden Mengen von Protein, Substrat und Wasser enthält das Reaktionsgemisch in 1 ml

Gesamtvolumen folgende Substanzen [4]:

Lösung	Konzentration und Volumen der zugesetzten Lösung	Konzentration im Testansatz
Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit EDTA	0,5 M 0,05 M 0,2 ml	0,1 M 0,01 M
NADPH-Lösung	0,5 mM 0,2 ml	0,1 mM
DTNB-Lösung	1 mM 0,2 ml	0,2 mM

DTNB wird in 0,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8,0 und Ethanol gelöst (4 mg DTNB + 1 ml Ethanol + 9 ml Tris-Puffer)

In gleicher Weise kann Glutathion-Reduktase-Aktivität bestimmt werden, dann enthält der Testansatz statt Thioredoxin als Substrat 5 mM oxidiertes Glutathion. Beide Enzyme sind i. a. substratspezifisch und stören sich nicht. Mit DTNB können auch durch nicht-enzymatische Reduktion freigesetzte SH-Gruppen bestimmt werden (siehe 2.3.6). Die Farbreaktion wird dann im Volumen von 1 ml durchgeführt, das sich aus 0,7 ml Kaliumphosphatpuffer/EDTA
0,2 ml DTNB-Lösung
und 0,1 ml Analysenlösung zusammensetzt.

2.6.2 Chromatographie auf 2',5'-ADP-Sepharose 4B

NADPH-abhängige Thiredoxinreduktasen binden spezifisch an das Affinitätschromatographie-Material 2',5'-ADP-Sepharose, wie für die Enzyme aus E. coli und Leber gezeigt wurde [69,70]. Zur Isolation einer solchen Thioredoxinreduktase aus Scenedesmus - unter verschiedenen Bedingungen kultiviert - werden die Proteine des Rohextraktes nach der Streptomycinsulfatfällung mit festem Ammoniumsulfat oder Dialyse gegen entsprechend konzentrierte $(NH_4)_2SO_4$-Lösung fraktioniert (siehe auch 2.5). Alle Niederschläge werden gelöst, gegen 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,85) mit 2 mM EDTA dialysiert und über 2',5'-ADP-Sepharose-Säulen (1,2 x 12,0 cm) mit 1,4 ml-Fraktionen/10 min chromatographiert. Man wäscht die

Säulen mit Tris/EDTA-Puffer so lange, bis die Extinktion bei 280 nm im Eluat auf Null zurückgeht. Mit einem Puls von 5 ml 1,5 mM NADPH-Lösung in Tris/EDTA-Puffer werden gebundene Proteine von der Säule abgelöst. Die gesammelten Fraktionen dialysiert man gegen Tris/EDTA-Puffer, um NADPH zu entfernen und testet sie wie oben beschrieben.

2.7 Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinatchloroplasten

Fructose-1,6-bisphosphatase hydrolisiert Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat und anorganischem Phosphat, das im Aktivitätstest bestimmt wird.

Frischer Spinat (1 kg) wurde bei -80°C eingefroren und im Mixer unter Zusatz von Phosphatpuffer zerkleinert, wie in Lit. 12 beschrieben. Durch Säure- und Ammoniumsulfatfällung sowie Gelfiltration über Sephadex G-100 ließ sich das Enzym in genügender Reinheit zur Aktivierung durch Thioredoxin präparieren.

In Gegenwart niedriger Konzentrationen von Dithiothreit wird die Fructose-1,6-bisphosphatase durch Thioredoxin stimuliert [13].

Testansatz:
In 0,55 ml Tris-HCl Puffer, 0,1 M, pH 7,9 sind enthalten:

6 mM	Fructose-1,6-bisphosphat
4 mM	Dithiothreit
1 mM	Magnesiumsulfat
15 µg	Enzym

Bis zu 0,2 ml thioredoxinhaltiger Lösungen werden eingesetzt.

Versuchsdurchführung:
Das Reaktionsgemisch ohne Substrat (0,5 ml) wird 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Zum Starten der enzymatischen Reaktion setzt man 0,05 ml Fructose-1,6-bisphosphatlösung zu. Nach 15 oder 30 min bei 30°C stoppt man die Reaktion durch Zusatz von 2 ml Phosphatreagenz und

mißt nach 5 min die entstandene Blaufärbung bei 660 nm.

Reagenzgemisch: (täglich frisch angesetzt)

125 ml Wasser
25 ml 9 N H_2SO_4
25 ml $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$; 6,6 g/100 ml
25 ml $FeSO_4$: 2 g $FeSO_4$ auf 24 ml H_2O + 1 ml 9 N H_2SO_4

Mit Hilfe einer Eichkurve läßt sich die Menge freigesetzten Phosphates bestimmen.

2.8 Bestimmung der PAPS-Sulfotransferase-Aktivität

Der Umsatz der 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat-Sulfotransferase aus Synechococcus 6301 wird durch die Anwesenheit von Thioredoxin stimuliert.

Testansatz in 1 ml Endvolumen:

0,28 mg Sulfotransferase
0,05 µMol $[^{35}S]$PAPS (spez. Aktivität 1720 cpm/nMol)
10 mM Dithiothreit
10 mM Mg^{2+} und
Thioredoxinfraktionen

Das Reaktionsgemisch wird unter Stickstoffatmosphäre 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von Träger-Sulfit und Säure wird flüchtiges $[^{35}S]SO_2$ in Alkali absorbiert und die Lösung im Scintillationszähler gemessen [76]. Diese Versuche wurden freundlicherweise von Prof. Dr. A. Schmidt im Botanischen Institut der Universität München durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis pflanzlicher Thioredoxine

3.1.1 Der Ribonucleotidreduktase-Test auf Thioredoxin-Aktivität

Die Ribonucleotidreduktasen aus E. coli und Scenedesmus obliquus reduzieren Ribonucleotide auf der Diphosphatstufe zu den entsprechenden Desoxyribonucleosiddiphosphaten. Als Reduktionsmittel legt man im in vitro-Test Dithiothreit (DTT) vor (Monothiole wie Mercaptoethanol sind unwirksam). Der Umsatz der E. coli-Ribonucleotidreduktase steigt proportional zur DTT-Konzentration an. Setzt man neben 2 mM DTT auch bakterielles Thioredoxin im Test ein, dann wird die Aktivität der Reduktase beträchtlich stimuliert [72]. Möglicherweise ist der K_M für das makromolekulare Thioredoxin wesentlich günstiger als für DTT, das dann seinerseits zur Regeneration des reduzierten Thioredoxins dient. Auf diesem Prinzip beruht der im Fall von E. coli-Ribonucleotidreduktase offenbar allgemeingültige enzymatische Test für Thioredoxine. Da Ribonucleotidreduktase von einer Testserie zur anderen oft erhebliche Aktivitätsschwankungen zeigt, muß in jeder Reihe eine Kontrollprobe gemessen werden, die alle Komponenten außer dem Pflanzen-Thioredoxin enthält. Die Umsatzsteigerung durch Zusätze wird dann durch einen Stimulationsfaktor ausgedrückt, der angibt, um wieviel die thioredoxinhaltige Probe aktiver ist als der Vergleichstest. Die E. coli-Ribonucleotidreduktase reagiert auf verschiedene Puffersalze empfindlich mit Aktivitätsänderungen [72], daher empfiehlt sich eine 14-stündige Dialyse aller Proben gegen Tris-Puffer und der Einsatz desselben Puffers (direkt aus dem Dialysegefäß) als Kontrolle. Derartige Reduktase-Tests wurden in dieser Arbeit wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben durchgeführt. Abb. 2 zeigt ein typisches Diagramm der Radioaktivitätsverteilung nach der Auftrennung der Reaktionsprodukte auf PEI-Cellulose-Dünnschichtplatten.

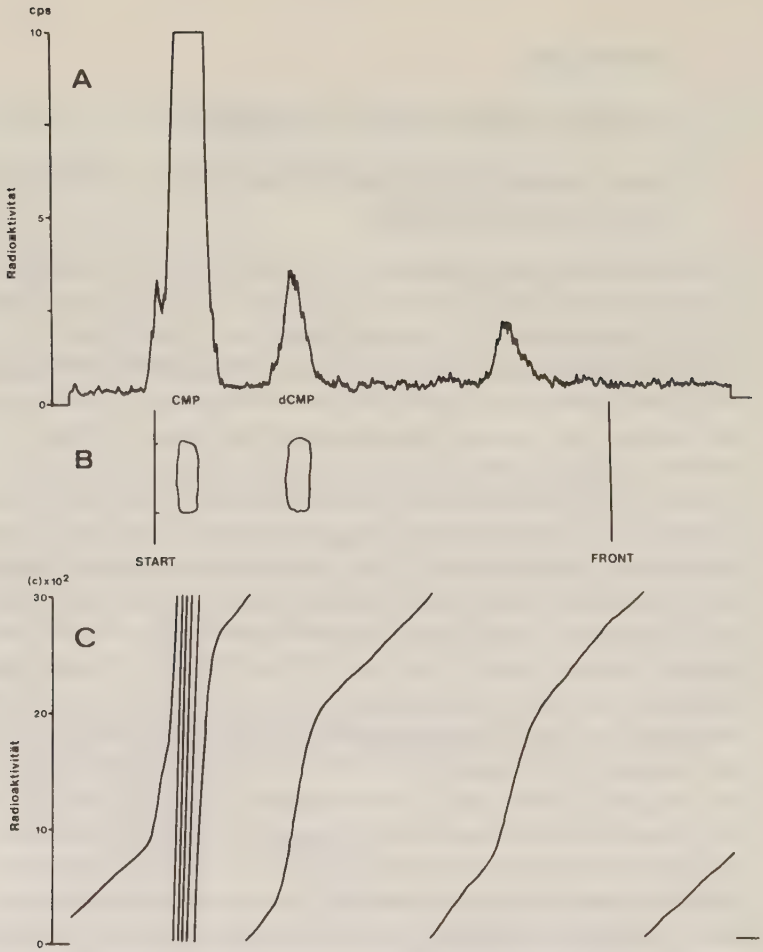


Abb. 2: Radioaktivitätsverteilung nach der Auftrennung der Reaktionsprodukte eines Ribonucleotid-reduktase-Tests

A Ratemeter-Diagramm; Vollausschlag 30 cps; Zeitkonstante 10 sec; Vorschubgeschwindigkeit 60 mm/h

B unter UV-Licht sichtbare, absorbierende Flecken der als Carrier zugesetzten Nucleotide

C Integrationsdiagramm; Vollausschlag 3 000 Impulse; Vorschub 60 mm/h

Im Normalfall findet man drei radioaktive Peaks. Am kürzesten ist die Laufstrecke für CMP, das über seine vicinalen OH-Gruppen in 2'- und 3'-Position mit der Borsäure des Fließmittels einen negativ geladenen Komplex bildet. Im dCMP ist die Boratverbindung nicht möglich, die Summe aller Ladungen ist daher um -1 geringer als im CMP, weshalb das reduzierte Nucleotid auf der positiv geladenen Ionenaustauscherschicht weiter wandert. Der dritte Peak ist nicht einheitlich. Hier finden wir Cytidin und Cytosin, während Desoxycytidin mit der Front läuft, ebenso der Phenolrotindikator. Folgende R_f-Werte wurden gemessen:

CMP	0,06-0,08
dCMP	0,3 - 0,4
Cytidin	0,7 - 0,8
Cytosin	0,7 - 0,8
Desoxycytidin	0,9 - 1,0

In seltenen Fällen entstehen auch Uracilderivate durch Desaminierung von Cytosinverbindungen. Sie laufen im Chromatogramm direkt vor den entsprechenden Cytosinabkömmlingen und werden bei der Berechnung des Reaktionsumsatzes diesen hinzuaddiert.

3.1.2 Reproduzierbarkeit der Meßwerte und Fehlerbetrachtung

Neben den üblichen Fehlerquellen enzymatischer Tests treten bei der Auswertung radioaktiver Analysen die statistischen Schwankungen des Kernzerfalls hinzu. Je geringer die absolute Zahl der gemessenen Impulse ist, umso stärker machen sich diese Unregelmäßigkeiten bemerkbar [81]. Während des Scannens einer Spur auf dem Chromatogramm werden vom Integrator durchschnittlich 18 000 Impulse registriert. Diese verteilen sich in der Regel auf drei diskrete Peaks, deren Verhältnis untereinander vom Umsatz während der enzymatischen Reaktion abhängig ist. Da bei dem hier bearbeiteten Problem ein sehr störanfälliger Test und zugleich z. T. sehr niedrige spezifische Aktivitäten zu beherrschen waren, ist eine Fehlerdiskussion erforderlich.

Zuerst soll hier die Reproduzierbarkeit der Meßmethode an sich überprüft werden. Dazu wird eine Bahn des Chromatogramms mehrfach hintereinander gescannt (6 cm/h) und jeweils die Verteilung in % CMP, % dCMP sowie % Nucleoside und Basen berechnet (Tab. 2).

Tab. 2 Reproduzierbarkeit der Zählausbeute bei siebenmaligem Scannen eines PEI-Cellulose-Dünnschichtchromatogramms

Lauf	% CMP	% dCMP	% Nucleoside und Basen
1	86,1	6,7	7,2
2	84,5	6,9	8,6
3	84,3	7,3	8,4
4	85,5	6,9	7,6
5	84,7	6,3	9,0
6	84,7	6,8	8,5
7	85,7	7,0	7,3

Die Bildung von Nucleosiden und Basen läßt sich nur schwierig ausrechnen, da die zugehörigen Peaks diffus verlaufen. Hier kommt zu den statistischen Schwankungen der Radioaktivität noch die Unsicherheit durch relativ großen Spielraum beim Auswerten; diese Daten werden nicht zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit des Meßverfahrens herangezogen, zumal sie im Normalfall nur etwa 10 % der Summe aus % CMP und % dCMP ausmachen. Die Mittelwerte der einzelnen Spalten ergeben sich zu 85,1 $\pm$ 0,8 % CMP, 6,8 $\pm$ 0,5 % dCMP, 8,1 $\pm$ 0,9 % andere. Diese prozentualen Umsätze spiegeln nicht die reinen statistischen Schwankungen wider, sondern errechnen sich aus drei unabhängig voneinander mit Fehlern behafteten Werten. Die Literatur [81] gibt für das Scannen von [^{3}H]-markierten Substanzen auf Dünnschichtplatten einen Gesamtfehler von $\pm$ 5 % an. Zur Überprüfung, ob dieser Fehler auch bei der verwendeten Meßmethode nicht überschritten wird, sind die relativen Schwankungen der über einem Einzelpeak registrierten Impulse heranzuziehen.

Die gemessenen Impulse liegen bei CMP, dCMP und über Nucleosiden und Basen im Bereich von 13 590 bis 15 060, 1080 - 1200 bzw. 1170 - 1590. Die Werte für dCMP und CMP schwanken um $\pm$ 4,9 % bzw. 5,0 % bezogen auf den Mittelwert; für den dritten Peak im Chromatogramm liegt der Fehler aus den bereits erwähnten Gründen bei $\pm$ 13,2 %, was aber nur unwesentlichen Einfluß auf das Endergebnis der dCMP-Bildung hat. Kombiniert man jeweils die entgegengesetzten Extremwerte von CMP und dCMP, so lassen sich die maximalen und minimalen Umsätze berechnen; sie ergeben 7,4 % bzw. 6,2 % dCMP entsprechend dem oben bestimmten Wert von 6,8 $\pm$ 0,5 % dCMP. Bei höheren Umsätzen im Enzymtest erhält man bis zu 60 % dCMP. In diesen Fällen ist der absolute Fehler mit $\pm$ 2-3 % zu veranschlagen. Wegen der Dauer des Scannens einer Spur, das etwa 3 Stunden in Anspruch nimmt, kann jede Probe nur einmal gemessen werden. Legt man die ermittelten Abweichungen zugrunde, so ist damit zu rechnen, daß das Ergebnis einer Einzelmessung höchstens um $\pm$ 1,0 % vom tatsächlichen Wert abweicht. Geht man vom Mittelwert 6,8 % dCMP als realem Wert aus, dann liegen die beiden Meßdaten, die am weitesten aus der Reihe herausfallen (7,3 % und 6,3 %) innerhalb dieser Grenzen. Betrachtet man den Meßwert 7,3 % aber isoliert, dann sollte man immer berücksichtigen, daß dieser sowohl zu einer Reihe mit Werten von 6,3 % - 7,3 % als auch zu einer mit 7,3 % - 8,3 % gehören könnte, wobei die zugehörigen Mittelwerte (6,8 % und 7,8 %) absolut um 1 % differieren. Ein absoluter Unterschied von 1 % darf bei so niedriger Anzahl registrierter Impulse daher nicht als Stimulation interpretiert werden.

Nun soll die Genauigkeit der chromatographischen Trennung von Substanzen auf den PEI-Platten überprüft werden. Dazu trägt man eine definierte Probe mehrfach auf und berechnet die Verteilung der Impulse auf die drei Peaks jeder Spur (Tab. 3).

Tab. 3: Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung

Spur	% CMP	% dCMP	% Nucleoside und Basen
1	83,5	7,0	9,5
2	84,4	6,5	9,1
3	84,4	6,8	8,8
4	84,3	5,6	10,1

Die Abweichungen von den Mittelwerten

CMP	$84,2 \pm 0,7$ %
dCMP	$6,5 \pm 0,9$ %
Nucleoside und Basen	$9,4 \pm 0,7$ %

liegen nicht über denen, die durch die Statistik des radioaktiven Zerfalls allein verursacht werden und im Rahmen der allgemeinen Meßgenauigkeit bei enzymatischen Tests. Die Trennung liefert also reproduzierbare Ergebnisse.

Bei der Suche nach Thioredoxin in Säuleneluaten werden Testreihen durchgeführt. Anhand des relativen Aktivitätsverlaufes kann man erkennen, ob ein Meßwert mit einem normalen Fehler behaftet ist oder ob es sich um einen "Ausreißer" handelt, dessen Signifikanz noch einmal überprüft werden muß. Nicht so evident ist das in Einzelmessungen und in Reihen, deren Aktivitätsverlauf nicht bekannt ist oder abgeschätzt werden kann. Alle diese Daten (z. B. "spez. Aktivität" des Thioredoxins während der einzelnen Stufen der Reinigung oder Gesamtausbeute an "Thioredoxin-Einheiten") sind jedoch in verschiedenen Aufarbeitungen prinzipiell reproduziert worden.

3.2 Thioredoxin in Algenzellen

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Frage nach einem geeigneten Test und Ausgangsmaterial zur Isolierung eines pflanzlichen Thioredoxins im Vordergrund. In Weizen- und Bohnenkeimen war es nicht gelungen, ein solches Protein mit Hilfe

der Reduktion von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) zu identifizieren [62], so daß spezifischere Testbedingungen für Thioredoxin gesucht werden mußten. Da sich herausstellte, daß synchronisierte Scenedesmus-Algen im Rohextrakt über hohe Ribonucleotidreduktase-Aktivität verfügen [60], lag die Vermutung nahe, daß diese Algen auch das zur Reduktion notwendige Thioredoxin-System enthalten. Als Routine-Test wurde jedoch die Bestimmung von bakterieller Ribonucleotidreduktase (E. coli) gewählt, weil dieses Enzym in genügender Menge und Reinheit präpariert werden kann.

3.2.1 Thioredoxin-Aktivität in Extrakten aus synchronisierten Algen

Bei anfänglichen Tests mit Algenextrakten und E. coli-Ribonucleotidreduktase trat keine signifikante Stimulation der Ribonucleotidreduktion auf, vielmehr wurde meist die Kontrollaktivität - gemessen mit Ribonucleotidreduktase und reinem Puffer - bei Anwesenheit von Algenextrakt noch weit unterschritten, was auf die Wirkung eines Reduktase-Inhibitors [95] zurückgehen könnte. Daneben traten vermehrt Hydrolyseprodukte von CDP, d. h. neben CMP auch Cytidin und Cytosin auf. In solchen Lösungen waren also Enzymaktivitäten enthalten, die mit der Ribonucleotidreduktase um das Substrat konkurrierten, während Folgeprodukte der Reduktionsreaktion nicht gebildet wurden. Unter dem Einfluß von Inhibitor und/oder Phosphatasen bzw. Nucleosidasen in den Pflanzenextrakten ließ sich die Ribonucleotidreduktase auch durch E. coli-Thioredoxin nur geringfügig oder überhaupt nicht stimulieren. Auf die Darstellung dieser Daten wird wegen der Heterogenität der experimentellen Bedingungen hier verzichtet. Der erste definitive Nachweis von Pflanzenthioredoxin gelang durch weitere Fraktionierung des Rohextraktes aus Scenedesmus nach Streptomycinsulfatfällung. In zwei Schritten wurden Proteine durch 40 %ige, danach durch 80 %ige Sättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällt und beide Sedimente (A 40 und A 80) getrennt gegen Puffer dialysiert. Zweck dieses Experimentes war der Versuch, die Algen-Ribonucleotidreduktase vom Thioredoxin zu trennen. Nach Re-

kombination beider Fraktionen in einem Test sollte der gemessene Reduktase-Umsatz die Summe der beiden Einzelaktivitäten übersteigen (Tab. 4).

Tab. 4 Thioredoxinaktivität in Proteinfraktionen aus Scenedesmus

Probe	% dCMP	% Nucleoside und Basen	Kalium-fluorid	Stimulations-faktor
1 A40	4,3	3,3	+	
2 A80	0,4	14,3	+	
3 A40 + A80	9,8	11,6	+	2,2 (zu Test Nr.1)
4 A40	5,1	4,5	-	
5 A80	0,4	23,1	-	
6 A40 + A80	7,4	33,4	-	1,4 (zu Test Nr.4)
7 HF80	0,0	5,9	+	
8 A40 + HF80	8,1	4,8	+	1,9 (zu Test Nr.1)

[5-^{3}H]CDP:spez. Aktivität 19 Ci/mMol

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, hat nur Fraktion A40 selbst nennenswerte Ribonucleotidreduktase-Aktivität. Durch Zugabe der A80-Proteine steigt der Umsatz um den Faktor 2,2 an. Führt man mit A80 eine Hitzedenaturierung durch und testet den Überstand (HF80), so ergibt sich ein ähnlicher Befund: HF80 hat selbst keine Enzymaktivität, stimuliert aber wiederum die Ribonucleotidreduktase in A40. Durch Vergleich der Proben 1-3 mit 4-6 wird deutlich, daß der Zusatz von Fluorid als Phosphatase-Inhibitor (8 mM) zum Test keinen signifikanten Einfluß auf die Ribonucleotidreduktase ausübt, die Bildung von Nucleosiden und Basen jedoch drastisch verringert.

Durch Fluorid und Hitzebehandlung werden die störenden Enzymaktivitäten, die zu Nucleosiden und Basen führen, inhibiert bzw. denaturiert (Tabelle 4), so daß man in angereicherten Thioredoxin-Fraktionen auf Fluorid verzichten kann.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Fraktion A40 Algen-Ribonucleotidreduktase enthält, während eine hitzestabile, stimulierende Aktivität in A80 bzw. HF80 nachzuweisen ist. Die erhaltenen Befunde sprechen dafür, daß es sich hier um das gesuchte pflanzliche Thioredoxin handelt.

Aus analogen Experimenten geht hervor, daß auch die E. coli-Ribonucleotidreduktase das pflanzliche Thioredoxin als Stimulator akzeptiert (Tab. 5) und daher, wie eingangs erwähnt, als Enzym für die folgenden Routine-Tests dienen kann.

Tab. 5: Algen-Thioredoxin und E. coli-Ribonucleotid-reduktase (RRase)

	Probe	% dCMP	Stimulationsfaktor
1	RRase	2,4	
2	A80	0,0	
3	RRase + A80	4,6	1,9 (zu Probe 1)

8 mM KF, [5-^{3}H]CDP verdünnt auf eine spezifische Aktivität von 77 mCi/mMol.

Um Thioredoxin selektiver mit Ammoniumsulfat fällen zu können, wird ein weiterer Trennungsschritt eingesetzt. Das Präzipitat von 40 %iger Sättigung wird separat getestet. Danach wird auf 60 % und 80 % gesättigte Sulfatlösung erhöht. Die getrennte Dialyse und Hitzefällung beider Sedimente führt zu den Proben A60 und A80 bzw. HF60 und HF80 (Tab. 6).

Tab. 6: Selektive Fällung von Thioredoxin, Test mit E. coli-Ribonucleotidreduktase (RRase)

	Probe	% dCMP	Stimulationsfaktor
1	RRase	2,7	1,0
2	RRase + A60	3,2	1,2
3	RRase + A80	6,4	2,4
4	RRase + HF60	4,7	1,7
5	RRase + HF80	5,6	2,1

8 mM KF, [5-^{3}H]CDP verdünnt auf spez. Aktivität von 0,38 Ci/mMol

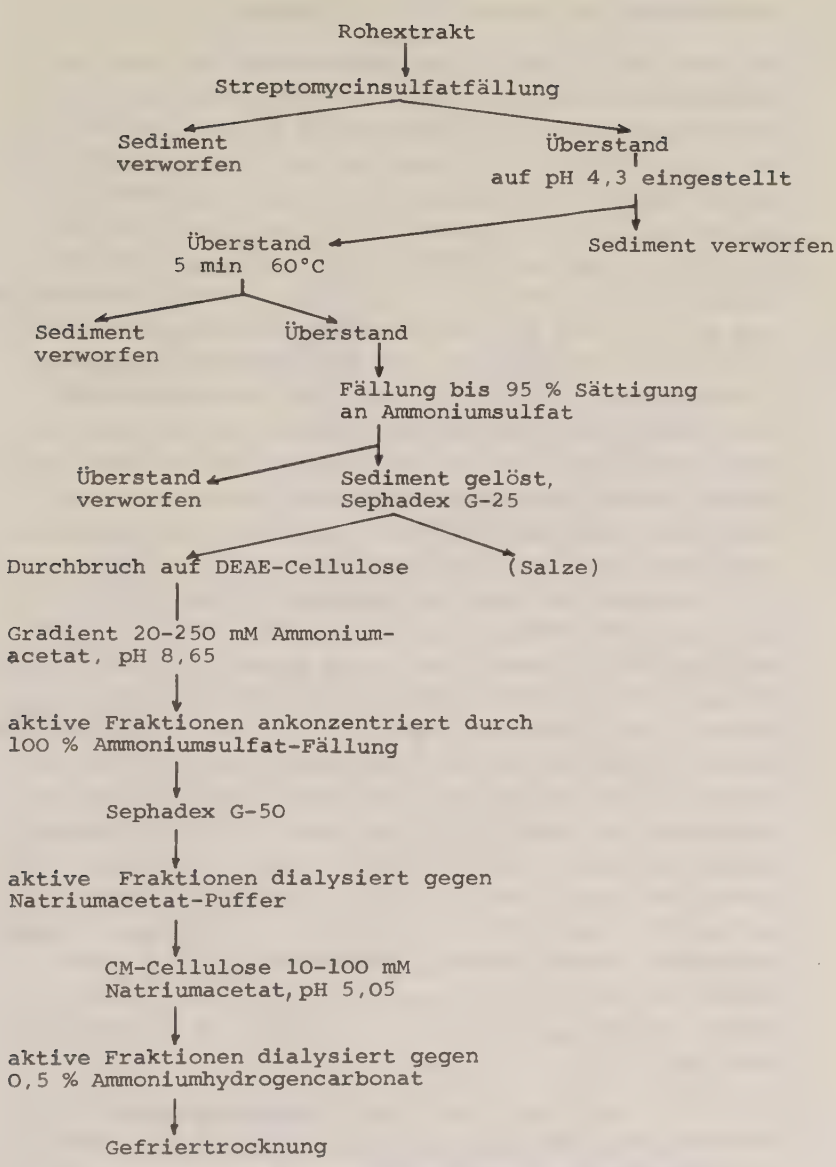
Die Hauptmenge von Thioredoxin fällt erst bei 60-80 %iger Sättigung mit Ammoniumsulfat; dies ist ein Hinweis auf ein kleines Protein. Bei manchen Aufarbeitungen synchroner Algen läßt sich keine Ribonucleotidreduktase-Aktivität (in A40) messen; der E. coli-Ribonucleotidreduktase-Test zeigt aber deutlich die Anwesenheit von Thioredoxin in diesen Algen. Das Auftreten von Thioredoxin ist offenbar nicht streng mit dem im Zellzyklus stark wechselnden Ribonucleotidreduktase-Gehalt gekoppelt und deshalb auch in nicht-synchronen Algenkulturen zu erwarten.

3.2.2 Isolierung der Algen-Thioredoxine aus batch-Kulturen

Führt man die im vorangegangenen Abschnitt geschilderten Experimente mit Algen aus batch-Kulturen durch, dann ergeben sich prinzipiell die gleichen Resultate bezüglich des Thioredoxins. Verzichtet man auf den Thioredoxin-Aktivitätstest im homologen System und mißt die Anreicherung nur mit E. coli-Ribonucleotidreduktase, so ist es möglich, die Algen in der einfachen, zeitsparenden und höhere Ausbeuten an Zellsubstanz liefernden batch-Kultur zu züchten. Alle folgenden Ergebnisse wurden deshalb mit Algen aus solchen Kulturen erhalten.

Zur Isolation von Thioredoxin wurden einige Vorversuche durchgeführt, um die Säurestabilität und Bedingungen für eine DEAE-Cellulose-Chromatographie auszutesten: Die Behandlung von Thioredoxin-haltigen Proben mit Essigsäure bis hinab zu einem pH-Wert von 4,3 führt nicht zu signifikanter Aktivitätsverringerung. Auf DEAE-Cellulose bewährt sich ein Gradient von 20-250 mM Ammoniumacetat, pH 8,65. Probiert man die Trennung mit Kaliumphosphatpuffer pH 7,3 (Salzgradient 20-200 mM) oder Tris-HCl-Puffer (pH 7,85) unter Zusatz von NaCl (20-200 mM), dann eluiert man die stimulierenden Thioredoxin-Fraktionen sowohl im Durchbruch als auch im Gradienten, so daß diese Systeme nicht brauchbar sind.

Ein komplettes Anreicherungsschema, das zu reinem Thioredoxin führt, ist im folgenden skizziert und wird im anschließenden Kapitel ausführlich beschrieben.


Rohextrakt
Streptomycinsulfatfällung
Sediment verworfen
Überstand
auf pH 4,3 eingestellt
Überstand
5 min 60°C
Sediment verworfen
Sediment verworfen
Überstand
Fällung bis 95 % Sättigung an Ammoniumsulfat
Überstand verworfen
Sediment gelöst, Sephadex G-25
Durchbruch auf DEAE-Cellulose
(Salze)
Gradient 20-250 mM Ammonium-acetat, pH 8,65
aktive Fraktionen ankonzentriert durch 100 % Ammoniumsulfat-Fällung
Sephadex G-50
aktive Fraktionen dialysiert gegen Natriumacetat-Puffer
CM-Cellulose 10-100 mM Natriumacetat, pH 5,05
aktive Fraktionen dialysiert gegen 0,5 % Ammoniumhydrogencarbonat
Gefriertrocknung

Aufarbeitung von Thioredoxin aus Scenedesmus

Gefrorene Zellen (68 ml) von Scenedesmus obliquus aus batch-Kulturen werden aufgetaut und mit Puffer auf 280 ml Suspension verdünnt. Durch Aufschluß in der Kugelmühle und anschließender Zentrifugation erhält man 590 ml Rohextrakt. Nach Zusatz von 147 ml 4 %iger Streptomycinsulfatlösung wird zentrifugiert und der Überstand weiter verarbeitet. Man stellt den pH-Wert (anfangs 7,05) mit Essigsäure rasch auf pH 4,30 ein, der flockige Niederschlag wird entfernt und der Überstand nach Neutralisation 5 min auf 60°C erwärmt. Nach der Zentrifugation muß noch über Glaswolle filtriert werden. Von allen Reinigungsstufen friert man Proben für die Aktivitätstests ein. Beim Ankonzentrieren der Proteine im Überstand der Hitzefällung werden thioredoxinhaltige Präzipitate sowohl bei 0-40 %, 40-80 % und auch noch bei 80-95 % Sättigung an Ammoniumsulfat erhalten. Zwar fällt die Hauptmenge zwischen 40 und 80 % Sättigung, um aber die Ausbeute nicht zu verringern, wird an die Hitzedenaturierung eine Totalfällung (95 % Ammoniumsulfat) angeschlossen. Vor diesem Schritt ist die Lösung goldgelb, danach fast farblos, und ein braunrotes Sediment wird abzentrifugiert. Zum Entsalzen trägt man das gelöste Präzipitat auf eine Sephadex G-25-Säule auf und eluiert mit dem Startpuffer der nachfolgenden Ionenaustauscherchromatographie. Die salzfreien Proteinlösungen des Durchbruches werden zur Weiterverarbeitung kombiniert. Diesen Pool bringt man auf DEAE-Cellulose und wäscht mit Startpuffer nach. Ein Teil der Proteine wird unter diesen Bedingungen nicht gebunden, während sich in der obersten Schicht der Säule eine 5 mm dicke, intensiv rotbraun gefärbte Bande abzeichnet. Ein typisches Elutionsdiagramm zeigt Abb. 3.

Thioredoxin wird bei einer Salzkonzentration von 140 mM Ammoniumacetat von der Cellulose eluiert. Durchbruch und nachfolgende Fraktionen enthalten nur geringfügige Thioredoxin-Aktivitäten, allerdings findet sich neben dem Hauptpeak (Fraktionen 29-36) auch noch ein kleiner in den Proben

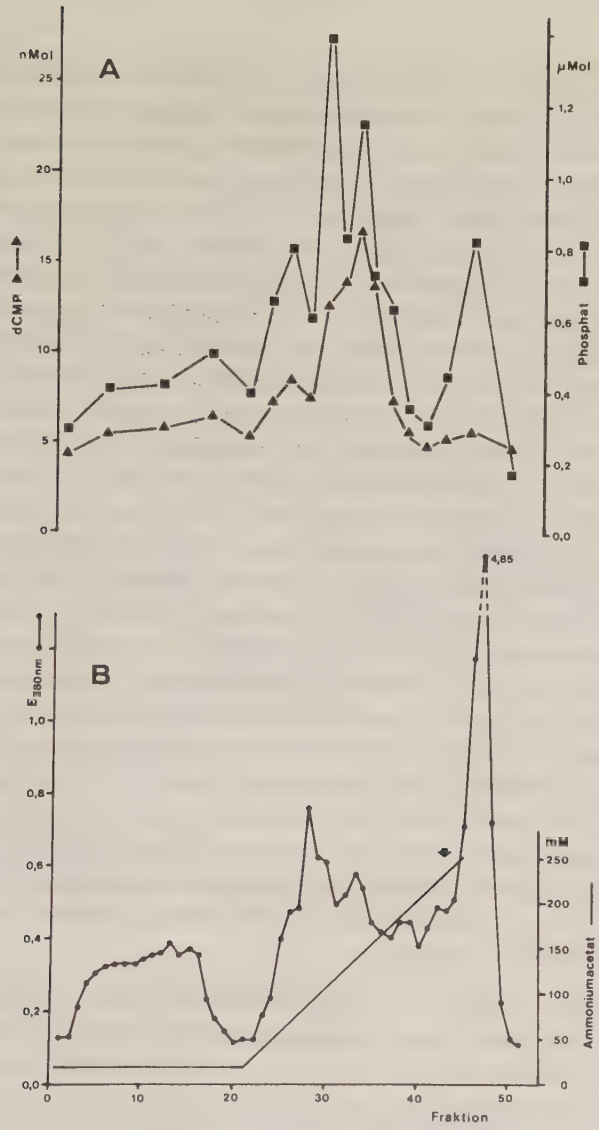


Abb. 3: Elutionsdiagramm von Algenextrakten auf DEAE-Cellulose

A Ribonucleotidreduktase-Aktivität ▲—▲; Fructose-1,6-bisphosphatase-Aktivität ■—■

B Proteingehalt ●—● und Salzgradient; der Pfeil markiert den Einsatz von 1 M Ammoniumacetat mit Mercaptoethanol

23-28. Wie bei der Aufarbeitung von Rattentumor-Thioredoxin[9] gezeigt wurde, neigt das Protein zur Aggregation auf der DEAE-Cellulose, was zu zwei diskreten Aktivitätspeaks führt. Durch vorherige Reduktion kann diese Verteilung beim Tumor-Thioredoxin verhindert werden. In einem weiteren Experiment wird daher die Proteinlösung vor der G-25-Gelfiltration mit 5 mM Dithiothreit reduziert, sonst aber unter denselben Bedingungen weiter verarbeitet. Das Elutionsdiagramm der Anionenaustauschersäule zeigt in diesem Fall auch weiterhin den kleinen Peak vor der Hauptmenge des Thioredoxins, so daß es sich bei dieser aktiven Fraktion wahrscheinlich nicht um ein bloßes Aggregat von Thioredoxinmolekülen handelt. Mit 1 M Ammoniumacetat (Pfeil in Abb. 3) eluiert man farbige Substanzen von der Cellulose. Zwei dieser Algenproteine können auf Grund ihrer charakteristischen Spektren identifiziert werden. Zuerst erscheint in Fraktionen 46 und 47 rotes Cytochrom f, erkennbar an seinem steilen Absorptionsmaximum bei 416 nm (γ-Bande) und dem kleinen Peak bei 553 nm [79]. Danach folgt braunes Ferredoxin in der oxidierten Form mit Maxima bei 273, 328, 420 und 464 nm im Spektrum [80]. Die Eluate 29-36 mit der höchsten Thioredoxin-Aktivität werden nun kombiniert und durch Dialyse gegen konzentrierte Ammoniumsulfatlösung gefällt. Man zentrifugiert den Niederschlag ab und löst ihn im kleinstmöglichen Volumen (2 ml) von Tris-HCl-Puffer auf, der 5 mM Dithiothreit enthält, um evtl. vorhandene Disulfidbrücken zwischen Thioredoxin-Molekülen zu spalten.

Die Proteine werden in mercaptoethanolhaltigem Puffer auf Sephadex G-50 nach ihren Molgewichten getrennt. Abb. 4 zeigt das Elutionsdiagramm der G-50-Säule. Thioredoxin tritt sowohl in den Fraktionen 34-40 als auch in 42-51 in Form zweier diskreter Maxima der Ribonucleotidreduktase-Stimulation auf, von denen das zweite etwa doppelt so hoch ist wie das erste. Durch Kalibrierung der Säule mit Proteinen bekannter Größe läßt sich den Substanzen jeder Fraktion ein definiertes Molgewicht zuordnen [82].

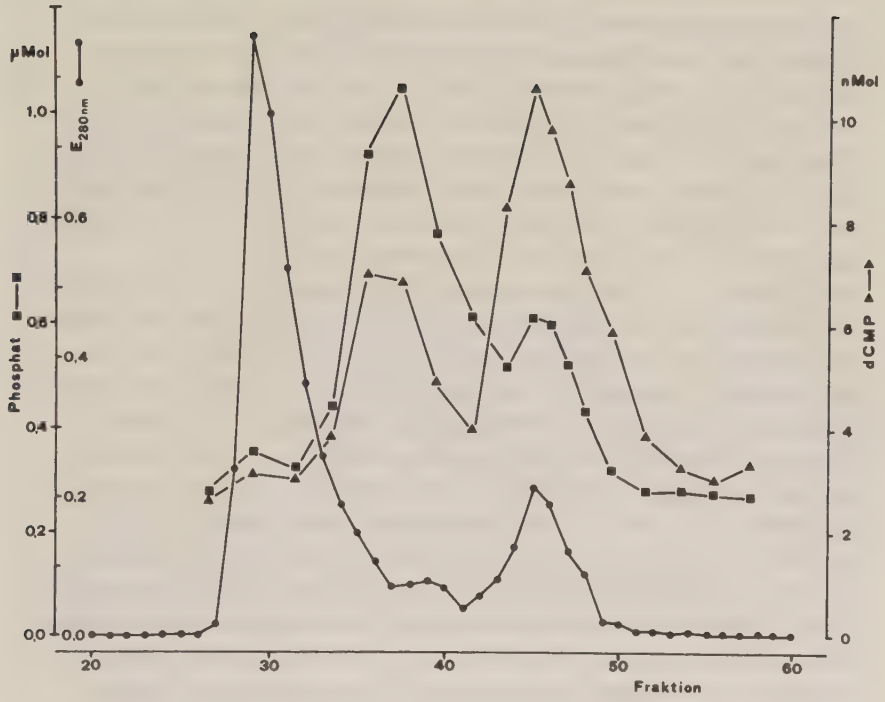


Abb. 4 Sephadex G-50-Gelfiltration der aktiven Fraktionen nach Ionenaustauscher-Chromatographie

Ribonucleotidreduktase-Aktivität ▲——▲

Fructose-1,6-bisphosphatase-Aktivität ■——■

Extinktion bei 280 nm ●——●

Die zum Kalibrieren der Säule eingesetzten Proteine, Ovalbumin (MG 45 000), Chymotrypsinogen (MG 25 000) und Cytochrom c (MG 13 500), wurden in den Fraktionen 30, 36 bzw. 44 eluiert.

Die Molmassen der beiden Thioredoxine werden so zu 23 500 und 12 600 bestimmt (siehe auch Kap. 3.2.4). Während das Molekül mit dem Molgewicht 12 600 sehr gut in die Reihe der bekannten Thioredoxine paßt, fällt das zweite mit 23 500 weit heraus. Vergleicht man die zwei Species, so liegt die Annahme nahe, daß das größere der beiden als dimeres Oxidationsprodukt über gemischte Disulfidbrücken aus zwei kleinen Molekülen hervorgegangen ist. Die Literatur beschreibt solche Aggregationstendenz bei E. coli-[2], Kalbsleber-[7] und Rattentumor-Thioredoxin[9], die durch Inkubation mit Reduktionsmitteln wie Dithiothreit überkommen wird. Zwar ging der Gelfiltration schon eine Reduktion mit DTT voraus, trotzdem werden die Proteine in einem weiteren Experiment mit 10 mM DTT behandelt und erneut in mercaptoethanolhaltigem Puffer chromatographiert, um Reoxidation auf der Säule zu verhindern. Das Resultat - zwei Aktivitätspeaks - bestätigt die vorausgegangenen Befunde vollständig, so daß in Algen zwei diskrete Thioredoxine unterschiedlicher Molekülgröße existieren müssen. Das höhermolekulare Material - im folgenden als Thioredoxin A bezeichnet - fällt nur in so geringer Menge an, daß eine nähere Charakterisierung noch nicht möglich ist. Die aktiven Fraktionen 42-51 des Hauptpeaks, die das Thioredoxin vom Molgewicht 12 600 - Thioredoxin B - enthalten, werden zur weiteren Reinigung gegen Natriumacetatpuffer dialysiert und auf CM-Cellulose chromatographiert (Abb. 5). Die Elution mit einem Salzgradienten führt zu zwei getrennten Peaks bei 30 bzw. 55 mM Acetat, deren Aktivität exakt parallel der Proteinkonzentration verläuft. Durch Rechromatographie dieser Thioredoxine (Thioredoxin BI und Thioredoxin BII) in getrennten Läufen läßt sich überprüfen, ob eines in das andere umwandelbar ist. Dazu dialysiert man sie einzeln gegen den Startpuffer und chromatographiert erneut über CM-Cellulose. Das Ergebnis zeigt, daß beide Thioredoxine auf CM-Cellulose stabil sind, da die Rechromatogramme jeweils nur einen einzigen Peak aufweisen. Thioredoxin BI wird bei 30 mM, Thioredoxin BII bei 55 mM Natriumacetatpuffer von der Säule gewaschen.

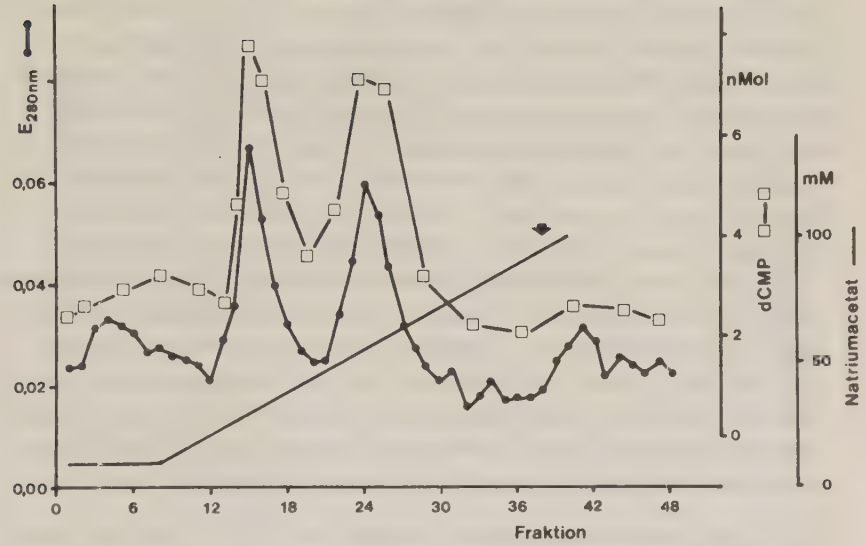


Abb. 5 Chromatographie der Ribonucleotidreduktase-stimulierenden Fraktionen (Thioredoxin B) auf CM-Cellulose

Ribonucleotidreduktase-Aktivität □—□
Extinktion bei 280 nm ●—●
der Pfeil markiert den Einsatz von 500 mM Natriumacetat

Nach Pufferaustausch gegen 0,5 % Ammoniumhydrogencarbonatlösung werden beide Thioredoxine getrennt lyophilisiert.

Eine Zusammenfassung der während der Aufarbeitung gesammelten Daten enthält das Reinigungsschema Tab. 7. Alle Fraktionen werden vor dem Test mit E. coli-Ribonucleotidreduktase durch 5 mM DTT reduziert und danach gegen Tris-HCl-Puffer dialysiert. Diese Aktivierung erweist sich als notwendig, weil ohne sie thioredoxinhaltige Proben im Ribonucleotidreduktase-Experiment den CDP-Umsatz (verglichen mit dem Kontrolltest) verringern, anstatt ihn zu stimulieren. Es wird angenommen, daß diese Fraktionen oxidierte Proteine enthalten, die im Enzymtest Reduktionsäquivalente verbrauchen, die nicht mehr auf die Ribonucleotidreduktase übertragen werden können. Reduziert man sie durch Vorinkubation mit DTT und dialysiert gegen Puffer mit dem SH-Schutzreagenz Mercaptoethanol, dann bleiben die freigesetzten Thiolgruppen erhalten und DTT, das selbst ein Substrat der Ribonucleotidreduktase darstellt, entweicht in den Dialysepuffer.

Thioredoxineinheiten werden willkürlich wie folgt definiert: Nach Abzug des Kontrollwertes vom Umsatz einer Probe bleibt der vom Thioredoxin verursachte Anstieg der Enzymaktivität. Dieser Wert stellt die Thioredoxinaktivität dar, die nach Bezug auf den Proteingehalt der Probe bzw. die Gesamtproteinmenge nach einem Reinigungsschritt zur spezifischen Aktivität in Einheiten/mg und der Thioredoxin-Gesamtmenge in Einheiten führt. Der Proteingehalt wurde bei Thioredoxin B I und B II spektroskopisch (280 nm), bei den vorangegangenen Proben durch den Lowry-Test bestimmt. Da der Extinktionskoeffizient dieser Thioredoxine noch nicht bekannt ist, muß die Extinktion von E = 1 für 1 mg Protein/ml angenommen werden; für E. coli-Thioredoxin ist diese Beziehung gut erfüllt. Da Fremdsubstanzen den empfindlichen Ribonucleotidreduktase-Test stören und diese Störung nicht ausgeschaltet werden kann, wird verständlich, daß in den ersten drei Reinigungsschritten formal ein Anstieg der Thioredoxin-Menge ermittelt wird, denn mit zunehmender Anreicherung des Thioredoxins - etwa 75 % des Gesamt-

Tabelle 7: Reinigung von Scenedesmus-Thioredoxin

Probe (150 µl)	ml	Protein mg	nMol dCMP/ 30 min	Stimulations-faktor	Thioredoxin-Ausbeute Einheiten	%	spez. Akt. Einheiten/mg
1 Rohextrakt	590	915	6,5	1,35	6687		7
2 nach Strept.-Sulfat	680	558	7,6	1,58	12693		22
3 Säure-Überstand	720	230	8,7	1,81	18720	100	81
4 Hitze-Überstand	720	94	7,6	1,58	13439	72	143
5 G-25-Durchbruch	154	82	12,6	2,63	8008	43	(98)
6 DEAE-Pool 29-36 [1]	87	12	12,7	2,65	9164	49	764
7 G-50-Pool 42-51 [1]	52	3	12,5	2,61	5339	29	1780
8 Thioredoxin B I	43	0,92 [2]	9,2	1,92	1261	13	1371
9 Thioredoxin B II	49	0,81 [2]	8,5	1,77	1209		1492
10 Kontrolle	-	-	4,8	1,00	-	-	-

[1] 75 µl Probevolumen

[2] Proteinkonzentration bei 280 nm gemessen

proteins werden dabei entfernt - verringern sich hemmende Einflüsse auf die Ribonucleotidreduktase, und die Stimulation durch Thioredoxin wird verstärkt meßbar. Tatsächlich nimmt also nur die spezifische Aktivität der Thioredoxin-Proben zu. Daher wird erst die nach der Säurefällung bestimmte Thioredoxin-Menge - ausgedrücktin Thioredoxin-Einheiten - für die Ausbeuteberechnung mit 100 % zugrundegelegt. Es ist nicht anzunehmen, daß bei der Streptomycinsulfatfällung ein größerer Materialverlust erfolgt. Wie im Diagramm zur Thioredoxin-abhängigen Stimulation der Ribonucleotidreduktase verdeutlicht wird (siehe unten, Abb. 9), steigt der Umsatz des Enzyms bei großen Thioredoxin-Mengen nicht mehr proportional zur Konzentration seines Cosubstrates an. Die weitgehende Sättigung der Ribonucleotidreduktase mit Thioredoxin in den Tests 5-7 zeigt sich dadurch, daß z. B. 75 µl des G-50-Pools einen Umsatz von 12,5 nMol, 150 µl aber nur 13,4 nMol dCMP bringen. Bei hochkonzentrierten Proben werden daher zu niedrige spezifische Aktivitäten ermittelt. Dies erklärt Schwankungen der spezifischen Aktivitäten innerhalb der Tab. 7, z. B. den Wert bei Schritt 5 . Vergleichbare Daten sind nur bei Stimulationsfaktoren in der Größenordnung von 1,3-2,5 vorhanden, weil in diesem Bereich das Verhältnis zwischen dem Thioredoxin-Gehalt im Testansatz und der Stimulation der Ribonucleotidreduktase annähernd linear ist. Für genaue Berechnungen der Ausbeute und der spezifischen Aktivität des Thioredoxins müßten daher bei jeder Probe Verdünnungsreihen angefertigt und getestet werden. In Anbetracht des umständlichen und zeitaufwendigen Reduktasetests ist dies aber nicht für eine größere Anzahl von Proben gleichzeitig durchführbar. Wegen der Dauer der Auswertung werden die endgültigen Ergebnisse einer Versuchsserie erst mehrere Tage nach den Tests bekannt. Einzelwerte können dann durch neue Messungen nicht mehr korrigiert werden, da die Absolutwerte des Ribonucleotidreduktase-Umsatzes zwischen mehreren Testreihen nicht direkt vergleichbar sind (s. auch 3.1.1). Die Daten in Tab. 7 liefern also nur Anhaltspunkte für die wirklichen Verhältnisse. Im Prinzip wurde jedoch der relative Gang aller Werte in zahlreichen Experimenten reproduziert.

3.2.3 Elektrolytische Reduktion von Thioredoxin zur Chromatographie auf aktivierter Thiolsepharose und Bestimmung von SH-Gruppen

Bei der Thioredoxin-Reinigung aus Algenextrakten haben wir auch nach direkteren Verfahren gesucht, da sich die Thioredoxine durch ihr Dithiol-System von den meisten anderen Proteinen unterscheiden sollten. Hierfür kam in erster Linie Affinitätschromatographie an einer Thiol-beladenen Säule wie "aktivierte Thiol-Sepharose 4B" in Frage. Bei der kovalenten Chromatographie auf Thiolsepharose 4B binden nur Proteine mit freien SH-Gruppen an die Matrix. Moleküle mit negativen Redoxpotentialen wie Thioredoxin (E_o' = -0,26 V) [15] liegen nach der Aufarbeitung in der Regel oxidiert, mit der Disulfidbrücke im aktiven Zentrum, vor. Weitere SH-Gruppen im Molekül bilden außerdem intermolekulare, gemischte Disulfidbrücken. Vor der Chromatographie auf Thiolsepharose ist daher eine Reduktion durchzuführen. Chemische Agenzien wie $NaBH_4$ oder Dithiothreit haben den Nachteil, daß ein Überschuß nach der Reaktion zerstört oder abgetrennt werden muß. Unter diesem Gesichtspunkt bietet die elektrolytische Reduktion [77] von Proteinen ideale Voraussetzungen für die nachfolgende Säulentrennung. Die Probe kann direkt aus dem Reaktionsgefäß entnommen und zur Chromatographie eingesetzt werden, da sie keine störenden Zusätze enthält. Während der Reduktion an einer Quecksilberkathode wird der Fortgang der Reaktion durch Bestimmung der freigesetzten SH-Gruppen mit DTNB verfolgt (siehe auch Kap. 3.3.1).

In der kommerziell erhältlichen Thiolsepharose 4B trägt die Sepharose-Matrix kovalent fixiertes Glutathion, dessen SH-Gruppe durch Bindung an 2-Thiopyridon aktiviert ist. Eine freie Mercaptogruppe im Protein tritt mit dieser reaktionsfähigen Disulfidbrücke in Wechselwirkung und spaltet Thiopyridon irreversibel reduktiv ab. Das angreifende Molekül wird dabei über eine neue Disulfidbindung kovalent an das Gel gebunden. Dagegen passieren

Substanzen ohne freie SH-Gruppen die Säule ungehindert. Zur Elution der gebundenen Proteine wird die Matrix mit einem Überschuß von Cystein oder Dithiothreit behandelt. Dabei verdrängt Cystein das Protein und wird selbst gebunden. Im Falle von Dithiothreit verläuft der erste Reaktionsschritt analog. Da das Molekül aber noch über eine zweite SH-Funktion verfügt, verdrängt es sich selbst von der Säule und wird in der oxidierten Form ausgewaschen, während der Glutathionrest an der Matrix mit freier SH-Gruppe vorliegt. Zur erneuten Aktivierung muß mit 2,2'-Dipyridyldisulfid behandelt werden, um die Ausgangsform der Thiolsepharose zu regenerieren.

Im Experiment wird Algen-Thioredoxin in Natriumacetat-Puffer gelöst. Nach 90 min Reduktion an der Quecksilberkathode trägt man die Lösung auf die Thiolsepharose auf und wäscht mit Puffer nach. Im Durchbruch der Säule erscheinen stark absorbierende Fraktionen mit 2-Thiopyridon. Bei der Elution mit Cystein werden gebundene Moleküle vom Gel getrennt.

Folgende Aktivitäten im E. coli-Ribonucleotidreduktase-Test werden erhalten (Tab. 8):

Tab. 8: Kovalente Chromatographie auf aktivierter Thiolsepharose 4B

Probe	% dCMP	Stimulationsfaktor
Thioredoxin nach Gefriertrocknung	6,6	1,9
Thioredoxin nach Reduktion	6,2	1,7
Durchbruch der Thiolsepharose	6,0	1,7
Eluat mit Cystein (25 mM)	4,2	1,2
Kontrolle mit Puffer	3,5	1,0

Wie man erkennt, wird die Aktivität des Thioredoxins durch die elektrolytische Reduktion erwartungsgemäß nicht beeinträchtigt, eine Bindung an die Matrix findet aber auch nicht statt. Dieser Befund, der in einem Kontrollexperiment auch mit E. coli-Thioredoxin erhalten wurde, läßt sich leicht erklären, wenn man annimmt, daß Scenedesmus-Thioredoxin so wie das entsprechende E. coli-Molekül über zwei SH-Funktionen verfügt. Sobald die erste SH-Gruppe gebunden ist, löst sich das Protein mit Hilfe der zweiten ab, die sich in direkter räumlicher Nachbarschaft befindet. Der Mechanismus kann also analog zur Reduktion des Säulenmaterials mit DTT verlaufen. Zusätzliche Mercaptogruppen scheinen im Molekül nicht vorzukommen oder sind unter diesen Bedingungen zu reaktionsträge (siehe aber unten und 3.2.5). Zur Isolation von Thioredoxin eignet sich die Thiolsepharose 4B nach diesen Ergebnissen also nicht.

Die elektrolytische Reduktion von Disulfidbrücken kann auch zu einer quantitativen Bestimmung von SH-Gruppen dienen, indem man die freigesetzten SH-Gruppen durch Reaktion mit 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) umsetzt [71].

Eine Probe von reinem Thioredoxin B I wird in 1 ml Natriumacetat-Puffer gelöst (E_{280} = 0,108) und reduziert. Während der Reaktion kann die Zunahme an freien SH-Gruppen durch den Farbtest mit DTNB ermittelt werden. Vor der Reduktion wird eine Extinktion von 0,007 bei 412 nm gemessen, danach 0,071. Aus dem Anstieg läßt sich in Kenntnis des Extinktionskoeffizienten ε_{412} = 13600 [83] die absolute Menge freigesetzter Thiolgruppen errechnen. Da der Extinktionskoeffizient von Thioredoxin nicht bekannt ist und mangels größerer Mengen des Proteins nicht bestimmt werden kann, wird die - für E. coli-Thioredoxin annähernd erfüllte - Annahme, daß die Extinktion E = 1 der Konzentration von 1 mg Protein/ml entspricht, den Berechnungen zugrunde gelegt. Bei der Reduktion von 108 µg Thioredoxin werden 46,3 nMol SH-Gruppen freigesetzt, pro Mol Thioredoxin also 5,4 Mol Thiolgruppen.

Während Thioredoxin B I unter den gegebenen Bedingungen schon nach 5 min vollständig reduziert ist, dauert die Reaktion bei Thioredoxin B II 25 min.

Tab. 9 zeigt die zeitabhängige Zunahme der freien SH-Gruppen während der Reduktion von Thioredoxin B II.

Tab. 9 Reduktion von Thioredoxin B II an der Quecksilberkathode

Probe	Reduktionszeit (min)	E_{412}
1	0	0,020
2	1	0,030
3	2	0,031
4	3	0,036
5	4	0,043
6	5	0,049
7	15	0,070
8	25	0,105
9	31	0,102
10	36	0,106

Zum Test werden 116 µg Thioredoxin B II (1 ml mit E_{280} = 0,116) entsprechend 9,2 nMol eingesetzt. Insgesamt erzeugt die Reduktion 60,3 nMol freie SH-Gruppen, also 6,6 Mol SH pro Mol Thioredoxin B II. Die Extinktion vor der Reduktion, aber in Gegenwart des Reagenzes deutet auf 1,6 Mol freie SH im Thioredoxin B II hin. Da vermutlich mehr SH-Gruppen als nur die beiden aktiven im Molekül vorhanden sind, bleibt vorläufig unverständlich, warum Thioredoxin nicht über die zusätzlichen Cysteine an die Thiolsäule bindet. Diese Ergebnisse müssen mit den Daten der Aminosäureanalyse verglichen werden (3.2.5).

3.2.4 Molekulargewichtsbestimmung und weitere Charakterisierung der Thioredoxine aus Scenedesmus

Zum Kalibrieren einer Gelfiltrationssäule trägt man unter konstanten äußeren Bedingungen Proteine bekannten Molgewichtes auf und mißt die Zeit bis zu ihrer Elution (Peak-Maximum). Werden diese Werte in Abhängigkeit vom Logarithmus des Molgewichtes des jeweiligen Proteins aufgetragen, so resultiert eine Gerade, die an beiden Enden abknickt [82]. Für eine G-75-Gelsäure, die globuläre Proteine mit Molgewichten zwischen 3000 und 70000 fraktioniert, werden 5 Proteine verwandt (Tabelle 10).

Tab. 10: Molgewichte und Elutionszeiten verschiedener Proteine auf Sephadex G-75

Protein	Molgewicht	log(Molgewicht)	Elutionszeit in Std.
Serumalbumin	67 000	4,83	6,00
Ei-Albumin	45 000	4,65	6,80
Chymotrypsinogen	25 000	4,40	8,85
Cytochrom c	13 500	4,13	11,05
Aprotinin	6 500	3,81	13,05

Abb. 6A zeigt die Absorptionspeaks der Eichproteine und die dazugehörige Molgewichtskurve.

Eine Thioredoxin-haltige Probe wird durch Fällung mit Ammoniumsulfat (100 % Sättigung) ankonzentriert, gelöst im Säulenpuffer und mit 5 mM DTT reduziert. Diese Probe bringt man auf die kalibrierte Sephadex-Säule und chromatographiert in Tris-Puffer mit Mercaptoethanol. Thioredoxin-Aktivität läßt sich nur in den Fraktionen 42-49 messen (Abb. 6B). Fraktion 45 bewirkt im Test maximale Stimulation der Ribonculeotidreduktase, daraus folgt unter Verwendung der Eichkurve (s. Pfeil in Abb. 6A) für Thioredoxin ein Molgewicht von 12 600.

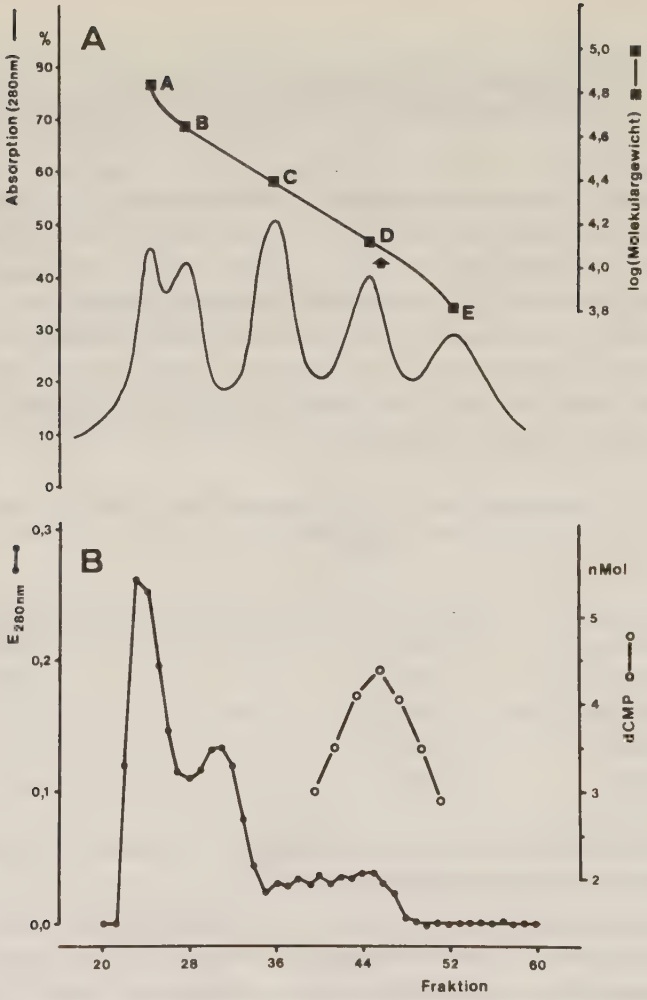


Abb. 6: Molekulargewichtsbestimmung auf Sephadex G-75

A: Absorption der Eichproteine bei 280 nm
Serumalbumin (A), Ei-Albumin (B) Chymotrypsinogen (C), Cytochrom c (D) und Aprotinin (E);
Logarithmus der Molgewichte ■—■

B: Elutionsdiagramm der Thioredoxin-haltigen Probe;
Ribonucleotidreduktase-Aktivität o—o
Extinktion bei 280 nm ●—●

Bei der analytischen Elektrophorese auf 7,5 %igen Polyacrylamidgelen bei pH 9,5 findet man für Thioredoxin B I und B II je eine einzelne Bande; beide Proteine sind also nach der CM-Cellulose-Chromatographie homogen. Auf einem Gel mit beiden Thioredoxinen läuft B II dicht vor B I, woraus bei gleichem Molgewicht (vgl. Abb. 6) auf verschiedene Struktur und/oder Ladung geschlossen werden kann (Abb. 7).

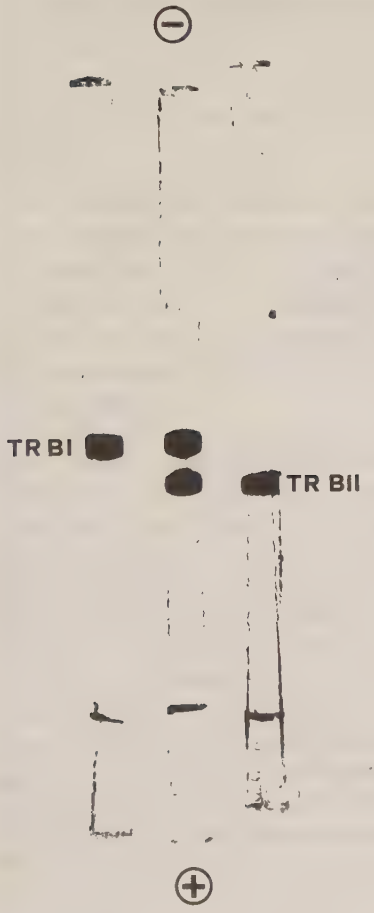


Abb. 7:
Analytische Gelelektrophorese von Thioredoxin B I und B II auf Polyacrylamidgelen.

Bei der isoelektrischen Fokussierung auf einem Ampholine-Gel (pH-Gradient von pH 4,0 bis 8,6 zwischen Anode und Kathode) wandert Cytochrom c als Referenzprotein zur negativen Elektrode und markiert so die Polarität des Gels. Thioredoxin B I und B II werden sowohl anodisch als auch kathodisch aufgetragen und bewegen sich jeweils zu der Stelle im Gel, an der der pH-Wert dem isoelektrischen Punkt der Proteine entspricht. Thioredoxin B I bildet eine scharfe Bande bei pH 5,2 im Gradienten, Thioredoxin B II bei pH 5,4. Beide haben aber noch eine zweite, schwache Bande bei pH 4,8 bzw. 5,2. Thioredoxin B II ist also das stärker basische Protein und wird daher - wie beobachtet - wegen der größeren positiven Ladung bei pH 5,05 auf CM-Cellu-

lose fester gebunden und erst durch höhere Ionenstärken eluiert als Thioredoxin B I.

Die UV-Spektren (Abb. 8) der beiden homogenen Thioredoxine unterscheiden sich in der Lage von λ_{max} (276 bzw. 280 nm) und bei 288 nm. Während Thioredoxin B I bei dieser Wellenlänge nur eine Schulter aufweist, findet man bei B II ein kleines, aber deutlich ausgeprägtes Maximum. Weitere Informationen, z. B. über andere absorbierende Bausteine neben Aminosäuren, sind diesen Proteinspektren nicht zu entnehmen.

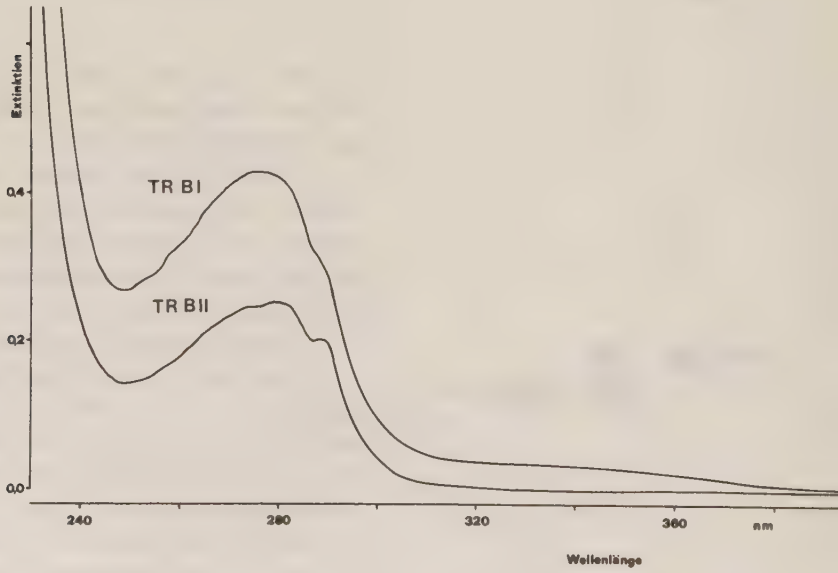


Abb. 8: UV-Spektren reiner Thioredoxin-Proben in Wasser (Thioredoxin B I und Thioredoxin B II)
Die Extinktionen sind nicht quantitativ vergleichbar, weil es sich um unterschiedliche Proteinkonzentrationen handelt.

3.2.5 Aminosäurezusammensetzung

Zum Vergleich der Thioredoxine verschiedener Herkunft, aber auch der beiden homologen pflanzlichen Proteine (Thioredoxin B I und Thioredoxin B II) ist deren Aminosäurezusammensetzung von großem Interesse. Besonders wichtig sind Informationen über den Cysteingehalt der Moleküle. Daher wurde die Analyse nach Oxidation der Proben mit Perameisensäure durchgeführt, die sowohl Cystein als auch Cystin quantitativ zu Cysteinsäure umsetzt. Methionin, das dabei in nicht-vollständiger Reaktion Methioninsulfon liefert, wurde parallel in nativen Proteinproben analysiert. Tryptophan wurde nicht bestimmt.

Zur Eichung des Aminosäureanalysators setzte man zwei reine Proteinpräparationen mit definiertem Cysteingehalt ein:
Ribonuclease A Molgewicht 13 700 8 Cystein-Reste
α-Chymotrypsin Molgewicht 21 600 10 Cystein-Reste.
Bezüglich des Cysteingehaltes stimmten die erhaltenen Analysendaten dieser Enzyme mit den Literaturangaben exakt überein.

Das Ergebnis der Mikroaminosäureanalyse von Thioredoxin B I und B II, die von Dr. Y. Samejima im Pharmakologischen Institut der Universität Gießen durchgeführt wurde, zeigt Tab. 11.

Im Gegensatz zu den einfachsten bekannten Thioredoxinen, die nur zwei Cysteinreste enthalten (Tab. 18), findet man in beiden Scenedesmus-Proteinen je vier. Damit haben die meisten Thioredoxine mehr Cystein als die zwei aktiven Reste im Molekül, denn auch die Proteine aus Kalbsleber und Novikoff-Tumoren [7,21,9] verfügen über vier bzw. sechs Halbcystine.

Tab. 11 Aminosäurezusammensetzung von Thioredoxin B I und B II

Aminosäure	Thioredoxin B I	Thioredoxin B II
Cystein	4	4
Asparagin(säure)	7	3
Threonin	6	5
Serin	8	7
Glutamin(säure)	8	14
Prolin	7	6
Glycin	9	13
Alanin	9	15
Valin	8	12
Methionin	2	2
Isoleucin	5	6
Leucin	7	5
Tyrosin	2	1
Phenylalanin	3	5
Lysin	6	10
Histidin	1	2
Arginin	2	2
Tryptophan	nicht bestimmt	
Gesamtzahl der Aminosäuren	94	112

Die Gesamtzahl der Aminosäuren in Thioredoxin B II stimmt sehr gut mit dem Wert überein, den man bei einem Molgewicht von 12 600 erwartet. Dagegen zeigt die Analyse im Falle von B I weniger Aminosäuren an, als dem gelchromatographisch gefundenen Molgewicht entspricht. Da Thioredoxin B I wesentlich mehr Asparagin(säure)reste als B II enthält, kann die Möglichkeit, daß B I ein Bruchstück von B II darstellt, wohl ausgeschlossen werden. Die Ursache der Diskrepanz kann z. Zt. nicht beurteilt werden. Eine Wiederholung der Analyse von B I war in Ermangelung größerer Mengen von reinem Thioredoxin nicht möglich.

In der Analyse wird nicht zwischen Asparagin und Asparaginsäure bzw. Glutamin und Glutaminsäure unterschieden. Die Summe dieser vier Komponenten ist in beiden Proteinen mit 15 bzw. 17 ähnlich. Geht man davon aus, daß die freien Carboxyl- und die Säureamidgruppen in B I und B II gleichmäßig verteilt sind, dann bestimmen die basischen Aminosäuren den Unterschied der isoelektrischen Punkte. Thioredoxin B II verfügt über vier Lysine und ein Histidin mehr als B I, was den höheren isoelektrischen Punkt von B II erklärt und auch dem Elutionsverhalten bei CM-Cellulosechromatographie entspricht. Weiterhin fällt auf, daß Thioredoxin B II wesentlich mehr hydrophobe Aminosäuren enthält als B I. Stärkere Hydratation von B I könnte somit für die geringere Laufgeschwindigkeit auf Polyacrylamidgelen verantwortlich sein.

3.2.6 Substrataktivität gegenüber den Ribonucleotidreduktasen aus E. coli und Scenedesmus

Da die oben beschriebene Reinigung des pflanzlichen Thioredoxins nach seiner Aktivität im E. coli-Ribonucleotidreduktase-Test vorgenommen wurde, kann erst der Einsatz als Cosubstrat der Algen-Ribonucleotidreduktase nachweisen, ob Thioredoxin auch mit diesem homologen Enzym aktiv ist. Isoliert man Thioredoxin durch Fällung bei 40-80 %iger Ammoniumsulfatsättigung und rekombiniert diese Fraktion mit dem Sediment von 0-40 % Sättigung (A 40), das die Reduktase enthält, dann findet man deutliche Stimulation des Umsatzes (Kap. 3.2.1). Auch nach Hitzebehandlung ist diese Thioredoxin-Fraktion noch aktiv. Nach weiteren Reinigungsschritten liegt der Umsatz der "stimulierten" Aktivität allerdings nur noch im Bereich des Meßfehlers der Kontrollprobe.

Reinigt man das Thioredoxin nach einem anderen Verfahren, in dem man Säurefällung und Hitzedenaturierung an den Anfang stellt, dann ist eine signifikante Wirkung dieser Proben auf die Ribonucleotidreduktase-Aktivität in A 40 (s. oben) überhaupt nicht zu erreichen. Vermutlich ist dies ein Phänomen der pflanzlichen Reduktase, das in 4.2

ausführlicher diskutiert wird. Erfahrungen im Umgang mit dem Enzym haben gezeigt [91], daß es durch konventionelle Schritte kaum zu reinigen ist. Nach Gelfiltration und Ionenaustauscherchromatographie ist die Aktivität nur noch in geringer Ausbeute nachzuweisen. Diese Befunde deuten darauf hin, daß das Enzym entweder als Protein instabil ist, irreversibel in Untereinheiten dissoziiert oder zur Aktivität eine weitere noch unbekannte Komponente (z. B. Radikal) braucht, die während der Reinigung abgetrennt oder zerstört wird. Stimulationsversuche mit gereinigtem Thioredoxin versprechen daher erst dann Erfolg, wenn es gelungen ist, die Scenedesmus-Ribonucleotidreduktase in intakter Form zu reinigen.

Inkubiert man steigende Mengen von Thioredoxin B I und B II im E. coli-Ribonucleotidreduktase-Test in Gegenwart von 2 mM Dithiothreit, so erhält man eine einzige Kurve der Konzentrationsabhängigkeit für beide Proteine (Abb. 9). Der absolute Thioredoxin-Gehalt wird photometrisch in der Annahme ermittelt, daß die Extinktion E = 1 bei 280 nm und 1 cm Schichtdicke der Konzentration 1 mg/ml entspricht (s. oben). Bei größeren Thioredoxin-Mengen steigt die Aktivität nicht mehr linear an, sondern man erhält - wie erwartet - eine Sättigungskurve. Hier wird deutlich, daß sich bei der Berechnung von Thioredoxin-Ausbeuten aus den zugehörigen Reduktaseumsätzen Fehlresultate ergeben, wenn die Konzentrationsverhältnisse nicht genau kontrolliert werden. Verändert man im Test bei sonst konstanten Bedingungen die DTT-Konzentration in den Proben mit und ohne Thioredoxin, dann erkennt man, daß DTT allein ein sehr schlechtes Substrat der Ribonucleotidreduktase ist; dies ist Voraussetzung dafür, daß ein Zusatz von Thioredoxin die Aktivität überhaupt stimulieren kann (Abb. 10). Aus den beiden Diagrammen lassen sich die K_M-Werte für die Thioredoxine und DTT berechnen. Sie liegen bei $5 \cdot 10^{-6}$ M bzw. $4 \cdot 10^{-2}$ M. Die Affinitäten von Thioredoxin und DTT zu der Ribonucleotidreduktase unterscheiden sich also um fast vier Größenordnungen. Der Zusatz von Thioredoxin beschleunigt die Reaktion im unteren Bereich der DTT-Konzen-

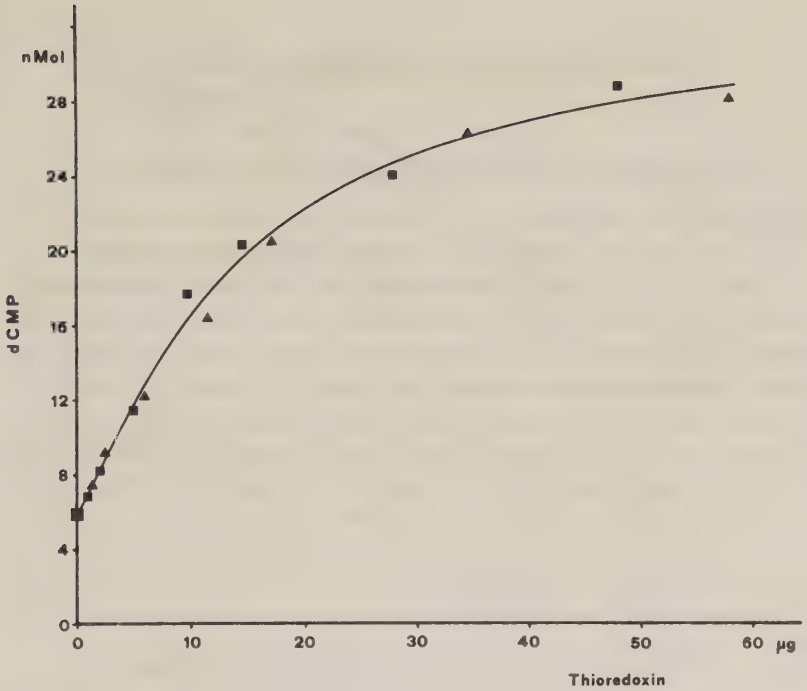


Abb. 9: Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Abhängigkeit von der Thioredoxin-Konzentration

Thioredoxin I ■ Thioredoxin II ▲

tration stark, mit steigendem Gehalt an Reduktionsmittel tritt der Unterschied zwischen den Umsätzen mit und ohne Thioredoxin immer mehr zurück. Für den Routinetest, in dem es darauf ankommt, die Stimulation der Ribonucleotid-reduktase-Aktivität durch geringe Mengen Thioredoxin sicher beobachten zu können, wird daher die Konzentration von 2 mM Dithiothreit gewählt.

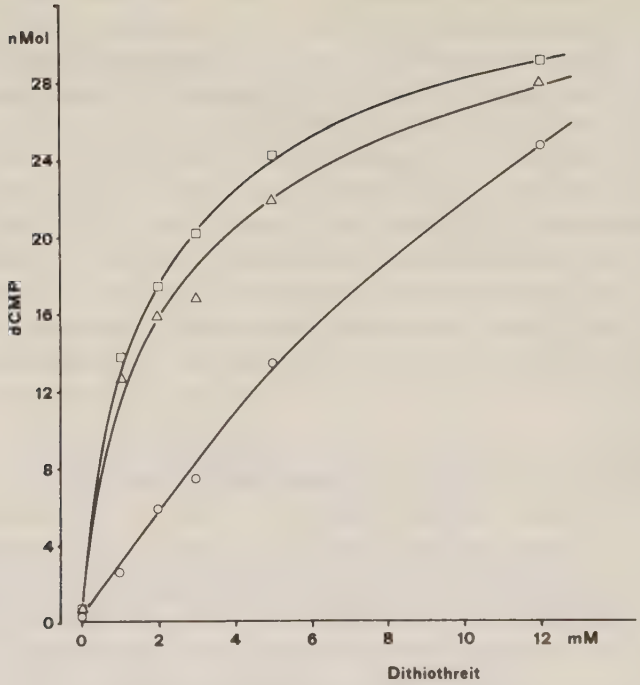


Abb. 10: Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Abhängigkeit von der DTT-Konzentration

ohne Thioredoxin o—o
10 µg Thioredoxin B I □—□
10 µg Thioredoxin B II △—△

3.3 Versuche zum Nachweis von Thioredoxinreduktase in Algen

3.3.1 NADPH-Abhängigkeit und Affinitätschromatographie

Um den Wasserstoff von NADPH via Thioredoxin zur Reduktion von Ribonucleotiden verfügbar zu machen, braucht der Organismus neben der Ribonucleotidreduktase auch eine Thioredoxin-Reduktase. NADPH-abhängige Enzyme wurden in E. coli, Hefe und Säugerorganen [16-23] nachgewiesen, nicht aber in Pflanzen. In fraktionierten Rohextrakten aus synchronisierten Scenedesmus-Algen zeigen sich Hinweise auf ein NADPH-abhängiges Thioredoxin-System (Tab. 12), doch ist hierbei keineswegs sicher, ob eine Reduktase der gesuchten Art oder ob sekundäre Effekte die beobachtete Stimulation verursachen.

Tab. 12: Hinweis auf Thioredoxinreduktase in synchronisierten Algen

Probe	% dCMP	% Nucleoside und Basen
1 A 40	0,6	2,3
2 A 80	0,5	7,0
3 A 40 + A 80	2,7	4,4

[5-^{3}H]CDP: spez. Aktivität 23 Ci/mMol; 8 mM KF; 1 mM NADPH, ohne DTT

Inkubiert man die dialysierten Lösungen der Sedimente nach Ammoniumsulfatfällung von 0-40 und 40-80 % Sättigung, A 40 und A 80 (siehe 3.2.1), in Gegenwart von NADPH als alleinigem Reduktionsmittel, so findet man in den getrennten Fraktionen sehr geringe, in der Rekombination der beiden aber deutliche Ribonucleotidreduktase-Aktivität. Aus früheren Versuchen ist bekannt, daß A 40 die pflanzliche Ribonucleotidreduktase und A 80 das Thioredoxin enthält. Beide für sich sollten mit NADPH inaktiv sein. Die Vereinigung der Fraktionen muß dann besseren CDP-Umsatz bringen, wenn in einer von beiden die NADPH-abhängige Thioredoxinreduktase zusätzlich vorhanden ist.

Ob die Reaktion tatsächlich NADPH verbraucht, läßt sich in solchen unreinen Enzympräparationen nicht feststellen, denn aus ungeklärter Ursache verringert ein NADPH-Zusatz zum Testgemisch die Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Gegenwart oder Abwesenheit von Thioredoxin.

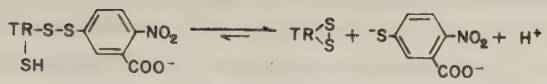
Zum Versuch, die vermutete NADPH-abhängige Thioredoxinreduktase zu isolieren, wurde die Affinitätschromatographie auf 2',5'-ADP-Sepharose eingesetzt [69,70]. Sowohl NADPH- als auch $NADP^+$-abhängige Enzyme binden an den trägerfixierten 2',5'-ADP-Rest (ein Bruchstück des Coenzyms), während NAD(H)-abhängige und andere Proteine nicht gebunden werden. Elution mit NADPH-Lösung setzt die gebundenen NADPH-abhängigen Enzyme frei (Reduktasen), während $NADP^+$-abhängige Dehydrogenasen nur mit dem oxidierten Coenzym vom Gel abgelöst werden können.

Im Experiment wurden die Fraktionen A 40 und A 80 aus batch-Kultur-Algen dialysiert und auf eine ADP-Säule gebracht. Nach der Elution mit NADPH konnte nur Glutathionreduktase-Aktivität, nicht aber die gesuchte Thioredoxinreduktase mit Hilfe des DTNB-Tests gemessen werden. Gemäß Gleichung 1 wird in diesem Test [2,16,71] Thioredoxin in Gegenwart von NADPH durch Thioredoxinreduktase reduziert.

$$\text{Thioredoxin-}S_2 + \text{NADPH} + H^+ \underset{\text{Reduktase}}{\overset{\text{Thiored.-}}{\rightleftharpoons}} \text{Thioredoxin-}(SH)_2 + NADP^+ \quad \text{(Gl.}$$

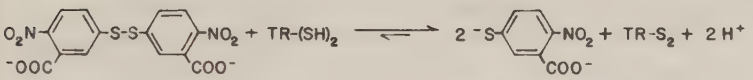
Damit gekoppelt reagiert Dithiobis(nitrobenzoesäure) mit den freigesetzten SH-Gruppen des reduzierten Thioredoxins über mehrere Stufen unter Bildung von 2 Mol farbigem substituiertem Thiophenolat, wonach Thioredoxin wieder oxidiert vorliegt (Gl. 2 und 3) [84].

(Gl.2



(Gl.3)

Das freiwerdende Proton wird vom alkalischen Puffer abgefangen. Als Bruttoreaktion wird also pro SH-Gruppe des Thioredoxins ein Thiophenolation abgespalten (Gl. 4), so daß die zeitabhängige Extinktionszunahme bei 412 nm ein Maß für die Geschwindigkeit der Thioredoxinreduktion ist.



(Gl. 4)

Aus der Summengleichung (Gl. 5) der Einzelreaktionen erkennt man,

$$NADPH + H^+ + DTNB \underset{\text{Thioredoxinreduktase}}{\overset{\text{Thioredoxin/}}{\rightleftharpoons}} 2\ TNB + NADP^+ \quad \text{(Gl. 5)}$$

daß DTNB katalytisch mit Hilfe von Thioredoxin und seiner Reduktase durch NADPH reduziert wird. Eine direkte Reaktion zwischen NADPH und DTNB findet nicht statt. Wird der Farbtest in Gegenwart einer konstanten Menge von Thioredoxin durchgeführt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Enzymkonzentration. Im Test auf Glutathion-Reduktase wird statt Thioredoxin oxidiertes Glutathion als Substrat eingesetzt, so können Glutathion- und Thioredoxin-Reduktase nebeneinander bestimmt werden.

Nachdem Thioredoxinreduktase in Algen aus batch-Kulturen nicht nachgewiesen werden konnte, wurden diese Experimente mit synchronisierten Scenedesmus-Zellen wiederholt. A 40 und A 80 wurden nach entsprechender Vorbereitung getrennt auf zwei ADP-Sepharose-Säulen chromatographiert. Auch unter diesen Bedingungen blieben sowohl Ribonucleotidreduktase- als auch DTNB-Test auf Thioredoxinreduktase ohne signifikante

Resultate. Mit dem kolorimetrischen Test konnte wieder starke Glutathion-Reduktase-Aktivität im A 80-Eluat gemessen werden. Als letzte Variante im Ausgangsmaterial wurde eine Kultur heterotroph gewachsener Algen unter ähnlichen Bedingungen wie oben aufgearbeitet. Die Fällungen erfolgten im Bereich von 0-40 % und 40-95 % Sättigung mit Ammoniumsulfat (A 40 und A 95). Während die dialysierten Sedimente und Säuleneluate im DTNB-Test wiederum keine Thioredoxinreduktase-, sondern nur Glutathion-Reduktase-Aktivität (hauptsächlich in A 95) zeigten, war ein Experiment mit E. coli-Ribonucleotidreduktase erfolgreicher. Versuche wurden jeweils paarweise mit bzw. ohne NADPH-regenerierendem System (NADPH/Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase/Glucose-6-phosphat) durchgeführt. Alle Tests enthielten etwa 1 µg Thioredoxin.

Tab. 13: NADPH-abhängige CDP-Reduktion in Gegenwart von E. coli-Ribonucleotidreduktase

	Probe	NADPH + G-6-P-System	% dCMP
1	A 40	+	1,9
2	A 40	-	2,3
3	A 95	+	4,6
4	A 95	-	0,9

[5-^{3}H]CDP: spez. Aktivität 0,46 Ci/mMol
NADPH 1 mM (ohne DTT), G-6-P 10 mM, G-6-P-Dehydrogenase aus Hefe 10 µg (60 units/mg)

Wie Tab. 13 verdeutlicht, findet in Gegenwart von NADPH eine signifikante Stimulation der Ribonucleotidreduktion durch Fraktion A 95 nach Dialyse statt, während die Aktivität von A 40 durch Zusatz des Coenzyms nicht beeinflußt wird. Man beobachtet hier also ähnlich wie in Tab. 12 eine deutliche NADPH-abhängige Reduktion von CDP mit Pflanzenextraktfraktionen. Jedoch ließ sich der Effekt nach Chromatographie der Fraktionen auf ADP-Sepharose nicht weiter

erhärten, so daß an eine Thioredoxinreduktase anderer Spezifität und Struktur als die bekannten Enzyme gedacht werden muß (vgl. auch 3.3.2).

3.3.2 Abhängigkeit von reduziertem Ferredoxin

Während seiner Experimente mit Spinatchloroplasten entdeckte Buchanan [12] eine Ferredoxin-abhängige Thioredoxinreduktase. Reduziertes Ferredoxin wurde durch Belichten funktionsfähiger Chloroplastenpartikel erhalten. In vitro kann noch ein zweiter Weg beschritten werden, um Ferredoxin zu reduzieren, und zwar über die reversible Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase-Reaktion [85] unter Vorgabe und ständiger Regeneration von NADPH.

Folgende Reaktionskette wurde daher im Experiment kombiniert:

$$\text{Glucose-6-phosphat} + \text{NADP}^+ \overset{1)}{\rightleftharpoons} \text{NADPH} + \text{Gluconolacton-6-phosphat} + \text{H}^+$$

$$\text{NADPH} + \text{Ferredoxin}_{ox.} + \text{H}^+ \overset{2)}{\rightleftharpoons} \text{Ferredoxin}_{red.} + \text{NADP}^+$$

$$\text{Ferredoxin}_{red.} + \text{Thioredoxin-S}_2 \overset{3)}{\rightleftharpoons} \text{Thioredoxin-(SH)}_2 + \text{Ferredoxin}_{ox.}$$

$$\text{Thioredoxin-(SH)}_2 + \text{CDP} \overset{4)}{\rightleftharpoons} \text{dCDP} + \text{Thioredoxin-S}_2$$

1) Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
2) Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase
3) Ferredoxin-abhängige Thioredoxin-Reduktase (gesucht)
4) Ribonucleotid-Reduktase

Neben der Vorgabe von Glucose-6-phosphat (10 mM) und NADPH (1 mM) wurde das Reaktionsgemisch durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Hefe (10 µg, 60 units/mg), Ferredoxin aus Clostridium pasteurianum (10 µM) und den üblichen Komponenten des Ribonucleotidreduktase-Tests supplementiert, jedoch ohne DTT; Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase und natürlich auch das Algen-Thioredoxin sollten

im getesteten Algenrohextrakt vorhanden sein. Clostridium-Ferredoxin wurde uns von Prof. R. Thauer, Fb Biologie, Marburg, zur Verfügung gestellt.

Die Durchführung der Versuche ergab überraschend, daß eine schwache CDP-Reduktion überhaupt nur dann eintrat, wenn das heterologe Ferredoxin nicht zugesetzt wurde. Da bekannt ist, daß pflanzliche Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktasen wie die aus Spinat bakterielles Ferredoxin akzeptieren und im Licht reduzieren [86], fällt eine Interpretation des Resultats nicht leicht. In dieser Situation ist wahrscheinlich ein prinzipieller Fehler in dem artifiziellen, viele Einzelschritte umfassenden System zu suchen, das von den Testbedingungen her nur für die Ribonucleotidreduktase optimiert war. So ist es möglich, daß die Reduktion des Bakterien-Ferredoxins in eine Sackgasse führte.

In den Testansätzen, die nicht mit Ferredoxin supplementiert waren, ist allerdings trotzdem das endogene Ferredoxin der Algen vorhanden (vgl. 3.2.2), das nach NADPH-abhängiger Reduktion mit Thioredoxin reagieren kann, wenn auch eine Ferredoxin-abhängige Thioredoxinreduktase in dem Rohextrakt enthalten wäre. Läßt man die negativen Befunde mit bakteriellem Ferredoxin außer acht und berücksichtigt die ergebnislosen Bemühungen bei der Suche nach einer Dinucleotid-abhängigen Thioredoxinreduktase (3.3.1), dann liegt folgende Hypothese nahe: Wenn es eine "normale" NADPH-Thioredoxinreduktase in Algen gäbe, dann wäre diese an der ADP-Sepharose fixiert worden. Da das aber nicht der Fall war, schließen wir ihre Existenz aus. Trotzdem ließ sich eine NADPH-abhängige Ribonucleotidreduktion im Rohextrakt und nach Ammoniumsulfatfraktionierung (A 95) messen (vergl. Tab. 13), was zu erklären ist, wenn neben Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase auch Ferredoxin-abhängige Thioredoxinreduktase in den Fraktionen enthalten war. Da diese Thioredoxinreduktase aber nicht an das Affinitätsgel bindet, ließ sich im Eluat der Säule keine

Aktivität mehr nachweisen. Andere Anreicherungsmethoden für ein solches Enzym konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erprobt werden.

3.4 Aktivität der Scenedesmus-Thioredoxine in weiteren Enzymreaktionen

3.4.1 Versuche zur Reaktion von Thioredoxin mit dem Glutathionsystem und mit Thioredoxinreduktase aus E. coli

In E. coli konnte neben Thioredoxin auch ein sogenanntes "Glutaredoxin" nachgewiesen werden [33], das sich im DTT-abhängigen Ribonucleotidreduktase-Test nicht vom Thioredoxin unterscheidet. In vivo existiert keine spezifische Reduktase für dieses Protein, vielmehr überträgt reduziertes Glutathion seinen Wasserstoff in einer nicht-enzymatischen Reaktion auf Glutaredoxin. Durch NADPH, Glutathionreduktase und Glutathion wird so immer ein Spiegel von reduziertem Glutaredoxin erhalten.

Im Ribonucleotidreduktase-Test mit diesem Cosubstrat setzt man statt DTT zur Reduktion nur das Glutathionsystem ein (10 mM NADPH; 4 mM Glutathion, reduziert; 10 µg Glutathionreduktase aus Hefe, spez. Aktivität 120 units/mg). Angereichertes Thioredoxin nach G-75-Gelfiltration katalysiert nicht die NADPH-abhängige CDP-Reduktion in diesem System und besitzt damit keine Glutaredoxinaktivität. Wie erwartet, läßt sich Algen-Thioredoxin nicht von der NADPH-abhängigen Thioredoxinreduktase aus E. coli reduzieren, da dieses Enzym wie alle Thioredoxinreduktasen im allgemeinen eine hohe Spezifität für sein Substrat aufweist (Abb. 14). Der Test auf freie SH-Gruppen mit Dithiobis-(nitrobenzoesäure) kann daher solange nicht zum Auffinden von Thioredoxin-haltigen Proben eingesetzt werden, bis die homologe NADPH-abhängige Thioredoxinreduktase aus Algen gefunden ist.

3.4.2 Aktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinat

Fructose-1,6-bisphosphatase katalysiert die Hydrolyse der Esterbindung in 6-Stellung von Fructose-1,6-bisphosphat. Die Menge freigesetzten Phosphats wird kolorimetrisch bestimmt.

Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinat wird durch das homologe Chloroplasten-Thioredoxin in der reduzierten Form aktiviert. Da auch das bakterielle Thioredoxin aus E. coli diese Funktion übernehmen kann [24], wird untersucht, ob Algen-Thioredoxin ebenso zu dieser Aktivierung fähig ist. Schon im Rohextrakt und aus Proben nach den ersten Fällungsschritten erhält man ein positives Ergebnis (Tab. 14). Nach der DEAE-Cellulose-Chromatographie stimulieren dieselben Fraktionen, die im Ribonucleotidreduktase-Test aktiv sind, auch die Phosphatase, wobei die Stimulationsfaktoren für beide Reaktionen ähnliche Größe haben. Im nächsten Schritt (G-50) zeigen Fraktionen aber in der Nucleotidreduktion sehr viel stärkeren Effekt als bei der Phosphathydrolyse. Daher kann vermutet werden, daß für jede Reaktion ein spezifisches Protein verantwortlich ist und das Fructosebisphosphatase-aktivierende Thioredoxin im G-50-Pool nicht mehr enthalten ist. Um diesem Phänomen nachzugeben, werden alle Fraktionen der DEAE-Cellulose-Chromatographie und der Gelfiltration parallel auf beide Aktivitäten getestet. In Abb. 3 ist das Ergebnis graphisch dargestellt. Während der Ribonucleotidreduktase-Umsatz im wesentlichen einen starken Peak mit einer Schulter zeigt, findet man für die Fructosebisphosphatase-Aktivierung an dieser Stelle einen Doppelgipfel, dessen Spitzen mit der Schulter der Ribonucleotidreduktase-Aktivitäts-Kurve bzw. ihrem Maximum zusammenfallen. Dies bestätigt, daß zwei verschiedene Proteine auf beide Enzyme stimulierend wirken. Daneben gibt es zwei weitere Fraktionen, die die Fructosebisphosphatase aktivieren, im Bereich der Elution von Cytochrom f und Ferredoxin, sowie bei niedriger Ionenstärke des Gradienten, wo auch die Ribonucleotidreduktase

eine schwache Stimulation erfährt. Bei der Gelfiltration auf Sephadex G-50 gelingt eine Auftrennung der Aktivitäten in zwei separate Peaks (Abb. 4). Thioredoxin B mit dem Molgewicht 12 600 stimuliert hauptsächlich die Ribonucleotidreduktase-Reaktion, die Fructosebisphosphatase aber nur wenig. Thioredoxin A (Molgewicht 23 500) wird früher eluiert und wirkt spezifisch stärker auf die Fructosebisphosphatase als auf die Ribonucleotidreduktase. Hier handelt es sich, wie in der Diskussion noch weiter begründet wird, wahrscheinlich um ein chloroplastidäres Molekül. In Analogie zum Spinat-Thioredoxin ist es wesentlich größer als die Thioredoxine, die normalerweise mit der Ribonucleotidreduktion assoziiert sind. Jedoch wird auch deutlich, daß beide Moleküle nicht absolut spezifisch für eine einzige Funktion sind, sondern nur selektiv die eine vor der anderen bevorzugen:

Tab. 14: Vergleich der Aktivitäten in Fraktionen nach verschiedenen Aufarbeitungsstufen im Ribonucleotidreduktase- und Fructose-1,6-bisphosphatase-Test

	Probe	dCMP nMol	Stimulationsfaktor	P_i µMol	Stimulationsfaktor
1	Rohextrakt	6,5	1,35	-	-
2	Streptomycinsulfat-Überstand	7,6	1,58	0,99	3,67
3	Säure-Überstand	8,7	1,81	0,89	3,30
4	Hitzefällungsüberstand	7,6	1,58	0,76	2,81
5	G-25-Durchbruch	12,6	2,63	1,8	6,67
6	DEAE-Pool (Fr.29-36)	13,8	2,88	0,89	3,30
7	G-50-Pool (Fr.42-51)	13,4	2,79	0,52	1,93
8	Thioredoxin B I	11,1	2,31	0,35	1,30
9	Thioredoxin B II	8,5	1,77	0,32	1,19
10	Kontrolle	4,8	1,00	0,27	1,00

Aus der Tabelle 14 geht hervor, daß gemeinsame Reinigung der beiden Thioredoxine bis zur DEAE-Cellulose stattfindet. In den oben beschriebenen Hauptfraktionen der anschließenden Chromatographie auf Sephadex G-50 und CM-Cellulose liegen nur noch die Thioredoxine B I und B II vor, die bevorzugt Ribonucleotidreduktase aktivieren, da die Reinigung nach dem Kriterium maximaler Ribonucleotidreduktase-Stimulation vorgenommen wurde. Zur Austauschbarkeit der Thioredoxine in verschiedenen Enzymreaktionen siehe auch Kap. 3.5.

3.4.3 PAPS-Sulfotransferase aus Synechococcus

Die Blaualge Synechococcus 6301 verfügt über die Fähigkeit, aktives Sulfat in Form von PAPS bis auf die Stufe von Sulfid zu reduzieren. Der erste Schritt der Reaktion ist die Übertragung des Sulfatrestes auf einen Akzeptor mit freien Thiolgruppen in Gegenwart von Dithioerythrit [87]. Das katalysierende Enzym PAPS-Sulfotransferase reagiert nicht nur mit dem homologen Carrier sondern auch mit einem Faktor aus Spinat. Beide stimmen in charakteristischen Merkmalen mit den bekannten Thioredoxinen überein, z. B. Hitzestabilität und Molekülgröße (Kap. 3.5). Zur Klärung der Frage, ob Scenedesmus-Thioredoxin als Akzeptor der Sulfotransferase fungieren kann, dienten Austauschversuche, von Prof. A. Schmidt in München durchgeführt.

Im Test auf Sulfotransferase-Aktivität inkubiert man ^{35}S-markiertes PAPS mit dem Enzym in Gegenwart von Dithioerythrit und dem zu untersuchenden Faktor. Wird der Sulfatrest übertragen, dann bildet sich ein organisches Thiosulfat des Carriers mit radioaktivem Schwefel (^{35}S).

$$PAP^{35}S^{4-} + \text{Carrier-SH} \underset{\text{transferase}}{\overset{\text{Sulfo-}}{\rightleftharpoons}} PAP^{4-} + \text{Carrier-S-}{}^{35}SO_3^- + H^+$$

Setzt man nach der Inkubation unmarkiertes Sulfit zu, so tauscht dieses mit dem radioaktiven Rest aus.

$$\text{Carrier-S-}{}^{35}SO_3^- + SO_3^{2-} \rightleftharpoons \text{Carrier-S-}SO_3^- + {}^{35}SO_3^{2-}$$

Auf Zusatz von Säure wird radioaktives Schwefeldioxid ausgetrieben und in Alkalilösung absorbiert. Die Menge an freigesetztem markiertem Schwefeldioxid steigt proportional zur Konzentration des eingesetzten Faktors. Diese Reaktionsfolge ist wahrscheinlich, aber noch nicht mit letzter Sicherheit bewiesen. Da Dithiothreit zur Aktivität der Sulfotransferase notwendig ist, könnte eine alternative Wirkung des Faktors auch auf direkter Stimulation des Enzyms beruhen.

Führt man den Test mit Thioredoxin A (MG 23 500) durch, das nach der G-50-Gelfiltration erhalten wurde, dann kommt man zu folgenden Resultaten (s. Tab. 15).

Tab. 15: Thioredoxin A aus Scenedesmus im Sulfotransferase-System

Probe	Impulse (cpm)	nMol SO_2
Puffer ohne Thioredoxin	70	0,093
0,10 ml Thioredoxin A	202	0,267
0,20 ml	280	0,370
0,35 ml	304	0,402

PAPS: spez. Aktivität 756 cpm/nMol
Konzentration der Thioredoxin-Lösung: 1,1 A_{280}-Einheiten/ml

Durch Zusatz des pflanzlichen Thioredoxins wird die Aktivität der Sulfotransferase bis zum Faktor 4 stimuliert, d. h., das Enzym akzeptiert das heterologe Thioredoxin aus Scenedesmus in der Übertragungsreaktion.

Proben der beiden kleinen Thioredoxine B I und B II zeigen ähnliches Verhalten (Tab. 16), wobei die spezifische Stimulation von B I etwa viermal größer ist als die von B II. Damit wird deutlich, daß alle Thioredoxine aus Scenedesmus mit der Sulfotransferase reagieren (vgl. auch 3.5).

Tab. 16: Thioredoxin B I und B II im Sulfotransferase-Test

Probe	Impulse (cpm)	nMol SO_2
Puffer ohne Thioredoxin	312	0,42
0,05 ml Thioredoxin B I	2702	3,66
0,10 ml	3304	4,48
0,20 ml	3854	5,22
0,01 ml Thioredoxin B II	300	0,41
0,02 ml	312	0,42
0,05 ml	818	1,11

spez. Aktivität von PAPS: 738 cpm/nMol
Thioredoxin B I: 0,47 A_{280}-Einheiten/ml
Thioredoxin B II: 0,98 A_{280}-Einheiten/ml

3.5 Austauschbarkeit bakterieller und pflanzlicher Thioredoxine

Die Aktivität der Scenedesmus-Thioredoxine in offenbar nicht-artspezifischen Enzymsystemen ist Grundlage des verwendeten Tests mit Ribonucleotidreduktase aus E. coli, aber auch für zwei weitere Fälle nachgewiesen worden (Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinat, Sulfotransferase aus Synechococcus). Darin gleicht das Algen-Thioredoxin dem von E. coli, dessen Aktivität in allen genannten Enzymsystemen ebenfalls bekannt ist bzw. von uns hier gezeigt wurde. In diesem Zusammenhang war es wünschenswert und möglich, die Austauschbarkeit heterologer Thioredoxine systematischer als bisher zu untersuchen, denn die Existenz dreier verschiedener Proteine in derselben Zelle wirft prinzipielle Fragen über die Bedeutung der Thioredoxine im Stoffwechsel auf. Für diese Untersuchungen standen noch folgende Proteine bakteriellen und pflanzlichen Ursprungs zur Verfügung:
Zwei "Faktoren" aus Spinat (Molgewicht 15 800 [87]) und der Blaualge Synechococcus 6301 (Molgewicht 11 500 [87]), die die Sulfotransferase aus Synechococcus aktivieren, von Prof. A. Schmidt, München, isoliert;

E. coli-Thioredoxin (Molgewicht 11 657 [56]) nach dem Kriterium der Stimulation im Ribonucleotidreduktase-Test gereinigt, selbst präpariert;
Spinat-Faktor, der Fructosebisphosphatase aktiviert (Molgewicht 16 500), selbst präpariert sowie Vergleichsproben von Prof. Buchanan, Berkeley.

In der ersten Testreihe, die von A. Schmidt in München durchgeführt wurde, läßt sich zeigen, daß E. coli-Thioredoxin und der endogene Faktor aus Synechococcus - in ähnlichen Konzentrationen eingesetzt - gleiche Stimulation der Sulfotransferase dieser Blaualge, gemessen an der ^{35}S-Sulfit-Freisetzung, bewirken (Tab. 17). Ein sehr ähnliches Ergebnis wurde mit einer weniger reinen Präparation des Spinatfaktors erzielt.

Tab. 17: Stimulation der PAPS-Sulfotransferase aus Synechococcus 6301 durch Thioredoxine verschiedenen Ursprungs

Thioredoxin µl	aus Synechococcus	E. coli	Spinat
	nMol PAPS reduziert zu Sulfit		
0	0,99	0,99	0,99
10	2,87	4,64	5,53
20	5,09	6,72	12,49
50	12,20	11,48	18,96
100	14,17	16,42	18,45
150	17,29		
100, kein Enzym	0	0	0

Synechococcus-Faktor: 1,3 A_{280}-Einheiten/ml
E. coli-Thioredoxin: 2,0 A_{280}-Einheiten/ml
Spinat-Faktor: 14,6 A_{280}-Einheiten/ml (Reinheit etwa 50 %)

In einer zweiten Testreihe wurden alle drei Faktoren auf ihre Fructose-1,6-bisphosphatase-Aktivierung untersucht. Abb. 11 zeigt die Resultate, die mit geringen Mengen der schon im vorherigen Test verwendeten Lösungen erzielt wurden. Wir beziehen uns auf Volumina der authentischen Proben, da der Spinatfaktor nicht homogen ist (Reinheit etwa 50 %). Synechococcus-Thioredoxin ist am wenigsten, trotzdem aber signifikant aktiv, während die endogene Fraktion aus Spinatchloroplasten die stärkste Aktivierung der Phosphatase bewirkt. E. coli-Thioredoxin liefert mittlere Werte. In einem weiteren Versuch stimulierte auch Hefe-Thioredoxin (50 µg) den Umsatz.

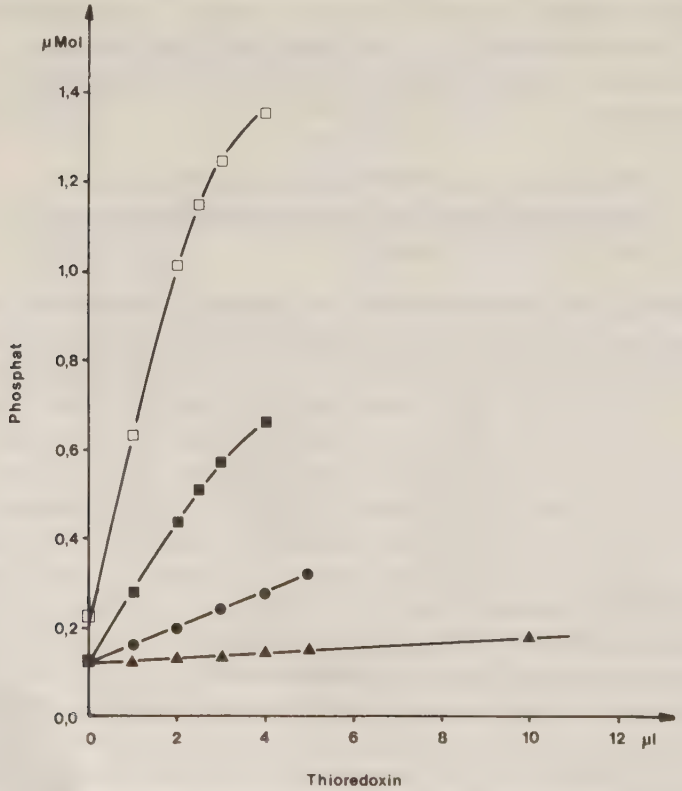


Abb. 11 Aktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase-Reaktion durch Thioredoxin-Fraktionen aus
Synechococcus 6301 ▲—▲
E. coli ●—● und
Spinat ■—■ in 15 minütiger Reaktion.
Spinat □—□ 30 min Inkubation
Konzentrationen wie in Tab. 17

Schließlich wurden diese Proteinfraktionen auch auf ihre Fähigkeit, die E. coli-Ribonucleotidreduktase zu stimulieren, untersucht. Die Parallelexperimente mit einer einzigen Ribonucleotidreduktase-Charge unter identischen Bedingungen ersparten komplizierte und zudem unzuverlässige Aktivitätskorrekturen (vgl. 3.2.2). Alle drei Proteine zeigen ähnliche Stimulation der Ribonucleotidreduktion, wenngleich das homologe Thioredoxin erwartungsgemäß am stärksten aktiv ist (Abb. 12). Da E. coli- und Scenedesmus-Protein homogen sind, wird die Konzentration in A_{280}-Einheiten angegeben. Für den Spinatfaktor legen wir den Berechnungen eine Reinheit von 50 % zugrunde.

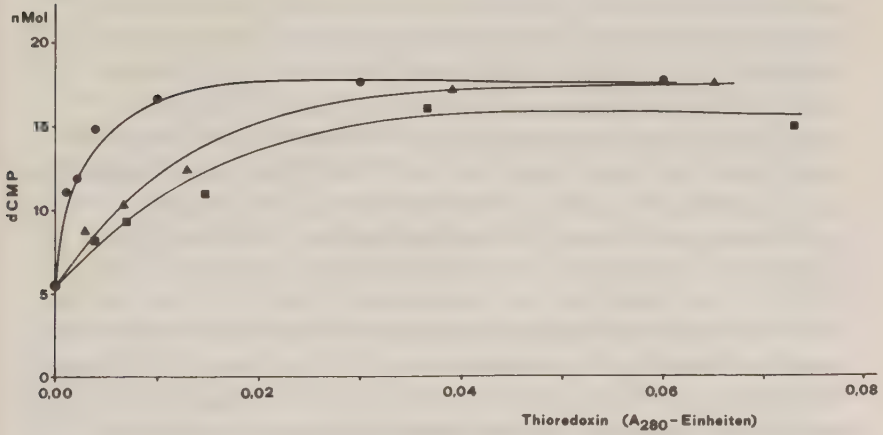


Abb. 12 Ribonucleotidreduktase-katalysierte Reduktion von CDP in Abhängigkeit von Thioredoxinen aus E. coli ●—● , Synechococcus ▲—▲ und Spinat ■—■

Aus den Daten der Abb. 12 lassen sich die K_M-Werte für Thioredoxin aus E. coli und Synechococcus berechnen, wenn man die oben erwähnte überschlagsmäßige Beziehung zwischen Extinktion und Proteinkonzentration berücksichtigt (E = 1 entspricht 1 mg Protein/ml). Für E. coli-Thioredoxin erhalten wir den Wert $K_M = 0{,}5 \cdot 10^{-6}$ M, für Synechococcus $K_M = 4 \cdot 10^{-6}$ M.

In einem zusätzlichen Versuch wurden zwei Thioredoxin-proben von B. B. Buchanan getestet. Dabei handelt es sich um den Faktor ARP_b der Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinat mit starker und um eine chromatographisch verschiedene Fraktion mit geringerer Stimulation im Phosphatase-Test. Im Gegensatz zum eigentlichen Chloroplasten-Thioredoxin (Hauptfraktion) zeigte diese zweite Fraktion im Ribonucleotidreduktase-Experiment keine Wirkung.

Der hitzestabile Faktor aus Synechococcus kann hier als ein Thioredoxin identifiziert werden, ebenso der Spinat-Faktor, der nach seiner Aktivität in der Sulfotransferase-Reaktion gereinigt wurde und im Ribonucleotidreduktase-Test eine den beiden anderen Thioredoxinen ähnliche Stimulation bewirkt. Hier ist erstmals in direkten Kreuzexperimenten demonstriert worden, daß die Sulfotransferase-Faktoren tatsächlich Thioredoxin-Aktivität im klassischen Sinne besitzen (vgl. 1.1.3). Vergleicht man den Spinatfaktor (ARP_b), der die Fructose-1,6-bisphosphatase aktiviert, mit dem Sulfotransferase-aktiven Faktor, so zeigen beide neben dem gleichen Molgewicht auch sehr ähnliche Reaktionen in diesem Test, woraus man schließen kann, daß es sich um eine einzige Thioredoxin-Species handelt, die drei verschiedene Aktivitäten stimuliert.

Während das durch Ultrazentrifugation bestimmte Molekulargewicht des ARP_b in der Literatur [37] mit "ca. 20 000" angegeben wird, machen Gelfiltrationsexperimente, die von A. Schmidt und auch in unserem Labor durchgeführt wurden, einen Wert von 16 000 wahrscheinlicher [87].

4. Diskussion

4.1 Nachweis von Thioredoxin in Scenedesmus obliquus

Da man in letzter Zeit drei pflanzliche Ribonucleotidreduktasen gefunden hat [59-61], die nach den bis jetzt untersuchten Eigenschaften in die Reihe der Reduktasen aus anderen Organismen passen, war es interessant und wichtig, zu erfahren, ob in Pflanzen auch ein Thioredoxin-System als Wasserstoffüberträger zwischen NADPH und der Ribonucleotidreduktase fungiert. Bei der Suche nach dem Thioredoxin-System ging ich davon aus, daß dieses bei gleicher Funktion über ähnliche Eigenschaften verfügen müßte wie die bekannten mikrobiellen und tierischen Vertreter. Als Untersuchungsobjekt boten sich unter den Pflanzen keimende Samen von Weizen und der Ackerbohne Vicia faba an, deren Ribonucleotidreduktasen schon bekannt waren, und die in großer Menge verfügbar sind. Zwei charakteristische Merkmale, in denen sich alle früher beschriebenen Thioredoxine und Thioredoxinreduktasen unterscheiden, sollten eine Trennung des Thioredoxin-Systems in seine Komponenten ermöglichen: Bei der Hitzebehandlung von Rohextrakten wird die Thioredoxinreduktase denaturiert, während Thioredoxin im Überstand aktiv bleibt. Durch Gelfiltration einer zweiten Probe läßt sich das niedermolekulare Substrat (Thioredoxin) vom Enzym (Thioredoxinreduktase) trennen. Ein erster Nachweis des gesuchten Systems ist dann nach Rekombination der Komponenten möglich. Die Anwendung dieses Konzepts brachte mit pflanzlichen Zellextrakten jedoch keinen Erfolg [62], da man mit dem unspezifischen DTNB-Test auf freie SH-Gruppen eine NADPH-abhängige Reaktion nicht zweifelsfrei beweisen konnte. Zahlreiche störende Proteine in allen Präparationen vereitelten eine Aussage allein auf der Basis dieses Testsystems. Bessere Aussichten auf Erfolg versprachen ein gleichzeitiger Wechsel des Untersuchungsobjekts und der Testmethode. Nach der Entdeckung der Ribonucleotidreduktase in der einzelligen Grünalge Scenedesmus obliquus [60], die nicht nur wesentlich

höhere Enzymaktivitäten liefert, sondern auch leichter in ausreichenden Mengen kultivierbar ist als Keime höherer Pflanzen, entschieden wir uns für diese Alge als Ausgangsmaterial für weitere Experimente. Am sichersten sollte sich Thioredoxin in synchronisierten Algen durch einen spezifischen Test nachweisen und isolieren lassen. Darauf wäre man in der Lage, mit dem reinen Protein als Substrat nach der Thioredoxinreduktase-Aktivität zu suchen.

Bei Kultur von Algen im Dauerlicht stellt sich eine statistische Verteilung von Zellen in allen Phasen des Zellzyklus zwischen zwei Mitosen ein. Da die Aktivität der Ribonucleotidreduktase aber nur während der kurzen DNA-Synthese-Phase notwendige Voraussetzung für die Vermehrung des Organismus ist, gelang es, die Ausbeute an Ribonucleotidreduktase durch Synchronisation der Algen beträchtlich zu steigern [60]. Unterwirft man die Zellen einem periodischen Licht-Dunkel-Wechsel von 14:10 Stunden, so erntet man in diesem künstlichen Wachstumsrhythmus mit einer Generationszeit von 24 Stunden eine Algenpopulation, die zur 12. Stunde einen hohen Gehalt an Ribonucleotidreduktase besitzt. Obwohl für die Aktivität des Thioredoxinsystems bislang noch keine Abhängigkeit vom Zustand und der Proliferationsphase einer Zelle bekannt ist, wurden diese synchronisierten Algen mit maximaler Ribonucleotidreduktase-Rate als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen gewählt, da Thioredoxin und die Thioredoxin-Reduktase wahrscheinlich während des gesamten Zellzyklus, sicher aber während der Zeit ihrer erwarteten physiologischen Funktion bei der DNA-Biosynthese anzutreffen sein mußten.

Wie die Voruntersuchungen mit Weizen- und Bohnenkeimlingen verdeutlicht hatten, schien der unspezifische Test mit Ellmans Reagenz für weitere Experimente untauglich, zumal er gleichzeitig die beiden gesuchten, unbekannten Komponenten des Thioredoxin-Systems zur Funktion voraussetzt. Zuverlässiger, wenn auch wesentlich aufwendiger ist dagegen der Ribonucleotidreduktase-Test auf Thioredoxin-Aktivität, d. h. der Nachweis der Substrataktivität reduzierten Thioredoxins gemäß der

Reaktionsfolge in Abb. 1 rechts. Alle bislang beschriebenen Thioredoxine (außer dem des T4-Phagen) werden von der Ribonucleotidreduktase aus E. coli als Substrat umgesetzt, wohingegen ein Austausch der Thioredoxine an der Thioredoxinreduktase nur in sehr wenigen speziellen Fällen möglich ist (vgl. Abb. 14).

In der Hoffnung, daß auch ein pflanzliches Thioredoxin mit der bakteriellen Ribonucleotidreduktase reagiert, züchteten wir im Großmaßstab die E. coli-Mutante B3, deren Thyminbedürftigkeit im Mangelmedium zu einer übersteigerten Neusynthese von Ribonucleotidreduktase führt [90,72], und isolierten das Enzym in hoher Reinheit. Für den Aktivitätstest (s. unter 2.4.2) mit radioaktivem Cytidindiphosphat wurde die Variante mit dTTP als allosterischem Effektor gewählt, weil ATP im Zusammenwirken mit Kinasen in Rohextrakten Veränderungen der Nucleotidphosphorylierungsstufen zur Folge haben und das entstehende ADP - selbst Substrat der Ribonucleotidreduktase - in Konkurrenz zum CDP treten würde. Jedoch ergaben sich auch bei dieser Testausführung wegen der ausgeprägten Störanfälligkeit der Reduktase erhebliche, unerwartete Schwierigkeiten: Ein geringer, aber spezifischer Umsatz in unreinen Fraktionen ist normalerweise ein sicherer Hinweis auf das Vorhandensein eines gesuchten Enzyms. Anders bei Tests für ein Protein wie Thioredoxin, das als Substrat eine gegebene Reaktion lediglich stimulieren soll. Im Ribonucleotidreduktase-Test wird üblicherweise DTT in niedriger Konzentration als Reduktionsmittel vorgelegt, was zu einer meßbaren Reduktion von CDP als Kontrollwert führt, und nach Zugabe von Thioredoxin erwartet man eine Beschleunigung der Reaktion. Unter Einwirkung von pflanzlichen Rohextrakten wird die Aktivität der Ribonucleotidreduktase aber durch verschiedene andere Enzyme und Substanzen so stark gestört, daß es letztlich zu einer Verringerung des Umsatzes kommt. Daran sind Phosphatasen, Nucleosidasen und Desaminasen beteiligt, die - wie die Analyse der Reaktionsprodukte zeigt - mit der

Ribonucleotidreduktase um das Substrat CDP konkurrieren. Daneben besitzen Pflanzen auch einen Ribonucleotidreduktase-Inhibitor, dessen Zusammensetzung jedoch noch ungeklärt ist [95]. Aus solchen verminderten Umsatzwerten läßt sich nicht erkennen, ob der Störung der Reaktion auch noch eine Beschleunigung überlagert ist, da beide Effekte von derselben Proteinfraktion ausgehen. Bestätigt wird diese Situation im Ribonucleotidreduktase-Test, wenn man neben Pflanzenextrakten reines E. coli-Thioredoxin zusetzt: Eine Stimulation wird auch unter diesen Bedingungen nicht erreicht.

Da diese negativen Erfahrungen viele Ursachen haben konnten, mußte die Möglichkeit überprüft werden, daß E. coli-Ribonucleotidreduktase ein pflanzliches Thioredoxin überhaupt nicht als Substrat akzeptiert. Deshalb wurde bei den folgenden Experimenten mit Algen-Reduktase gearbeitet. Es ließ sich zeigen, daß die Ribonucleotidreduktase bei 40 %iger Sättigung des Pflanzenextraktes mit Ammoniumsulfat quantitativ sedimentiert [91]. Als kleines Molekül blieb Thioredoxin im Überstand und nach weiterer Fällung (80 % Sättigung) verursachte diese Fraktion im Enzymtest erstmals eine signifikante Stimulation der CDP-Reduktion (Tab. 4).

Der aktivierende Faktor war außerdem hitzestabil, so daß er mit Sicherheit als pflanzliches Thioredoxin angesehen werden konnte. Bei der Inkubation dieses Proteins mit der E. coli-Ribonucleotidreduktase - unter Zugabe von Fluorid zur Hemmung störender Phosphatasen - ergab sich nun eine ebenso deutliche Umsatzsteigerung (Tab. 5). Für weitere Reinigungsschritte konnte daher die reichlicher vorhandene E. coli-Ribonucleotidreduktase als Testenzym eingesetzt werden. Während der Aufarbeitung verlieren Thioredoxin-haltige Proben durch Aufbewahren, wiederholtes Einfrieren und Auftauen rasch an Aktivität. Im Ribonucleotidreduktase-Test tritt dann keine Stimulation mehr ein, manchmal sogar Inhibierung des Umsatzes. Solche Fraktionen lassen sich durch Reduktion mit DTT und anschließender

Dialyse erneut aktivieren. Wie Abb. 10 zeigt, darf die Konzentration von DTT im Ribonucleotidreduktase-Inkubationsansatz nicht wesentlich größer als 2 mM sein, da anderenfalls der Kontrollumsatz schon zu hoch und nur noch schwach durch Thioredoxin stimuliert wird. Bringt man mit der Thioredoxin-Probe aber noch andere Proteine in den Test ein, deren SH-Gruppen als Folge der Aufarbeitung oxidiert sind, dann verbrauchen diese Proteine Reduktionsäquivalente, die nicht mehr zum Umsatz von CDP beitragen. Durch Vorinkubation mit DTT und Dialyse in Puffer mit SH-Schutzreagenz wird dieser Verlust vermieden.

In Kap. 3.1.2 wird die Reproduzierbarkeit des Ribonucleotidreduktase-Tests und der Auswertung auf Dünnschichtchromatogrammen besprochen. Es treten große Schwierigkeiten bei der Berechnung von Thioredoxin-Aktivitäten in "Einheiten" auf, die willkürlich definiert werden mußten. Zu fast allen bekannten Thioredoxinen wurden die zugehörigen Thioredoxin-Reduktasen gereinigt, die im Falle nicht-pflanzlicher Systeme NADPH-abhängig sind. Steht das homologe Enzym zur Verfügung, kann man zwischen zwei Testmethoden wählen, bei denen der Umsatz direkt proportional zum Thioredoxin-Gehalt verläuft: Wenn man die CDP-Reduktion über das Thioredoxin-System direkt an NADPH als Wasserstoffdonor koppelt und alle Partner in ausreichender Konzentration vorlegt, dann mißt man einen Thioredoxin-abhängigen NADPH-Verbrauch (Abb. 1). Der zweite Test arbeitet analog, nur wird statt Ribonucleotidreduktase und CDP als unphysiologischer Elektronenakzeptor die Dithiobis(nitrobenzoesäure) eingesetzt, die während der Reaktion das farbige Reduktionsprodukt bildet (3.3.1). Die Geschwindigkeit der Reduktion verläuft in beiden Tests proportional zum Thioredoxin-Gehalt der Probe. Diese Verfahren brauchen theoretisch keine Kontrollwerte, da NADPH weder mit der Ribonucleotidreduktase noch mit DTNB direkt reagiert und jeder gemessene Umsatz auf Thioredoxin zurückgeht. Dadurch liefern sie eindeutig definierte Thioredoxin-Einheiten.

Da eine NADPH-abhängige Thioredoxinreduktase bislang in Pflanzen nicht bekannt und die Kreuzreaktion mit anderen Thioredoxinreduktasen nicht möglich ist (vgl. Abb. 14), kann nur der Test mit DTT angewandt werden. Ein linearer Zusammenhang zwischen der Thioredoxin-Konzentration und dem Umsatz der Ribonucleotidreduktase besteht trotz weitgehender Sättigung mit CDP [92] jedoch nur bei kleinen Werten (Abb. 9). Stark angereicherte Thioredoxin-Proben stimulieren dann nicht mehr entsprechend ihrem Gehalt, und die "Einheiten" sowie die "spezifische Aktivität" steigen mit abnehmender Konzentration. Wegen des großen Aufwandes beim Test ist es aber praktisch unmöglich, für jede Probe eine Verdünnungsreihe anzusetzen. Andererseits können exakte Aktivitätsvergleiche nur innerhalb einer Meßreihe durchgeführt werden, so daß nachträgliche Korrekturen die Ergebnisse auch nicht verbessern. Die Aussage der Tabelle 7 stellt unter diesem Gesichtspunkt nur eine Orientierungshilfe zum Verlauf der Thioredoxin-Reinigung dar; der Gang der Daten konnte aber prinzipiell in zahlreichen Experimenten reproduziert werden. Die homogenen Proben von Thioredoxin B I und B II besitzen ferner zweifellos innerhalb der erzielbaren Genauigkeit gleiche spezifische Aktivitäten (vgl. Abb. 9). Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, findet man Thioredoxin nicht nur in synchronisierten Algen, sondern auch in Dauerlichtkulturen, d. h., das Auftreten von Thioredoxin ist im Gegensatz zur Ribonucleotidreduktase-Aktivität [60] nicht an einen spezifischen Zustand der Zelle innerhalb des Teilungszyklus gebunden. Aus diesem Grund konnten für die Isolation von Thioredoxin Algen aus batch-Kulturen verwandt werden. Dies steht im Einklang mit vergleichbaren Untersuchungen zum Stoffwechsel normaler und sich regenerierender Rattenleber [18] nach partieller Hepatektomie. Hier ergab sich der Befund, daß im proliferierenden Gewebe ein höherer Spiegel der Ribonucleotidreduktase-Aktivität induziert ist, während das Thioredoxin-System, gemessen am Normalwert, keine Steigerung erfährt. Folglich wird sowohl in Algen als auch in der Leber nur die Ribonucleotidreduktase-Synthese dem momentanen Enzymbedarf der Zelle angepaßt.

4.2 Isolierung und Charakterisierung von drei Proteinen mit Thioredoxin-Aktivität aus Scenedesmus

Thioredoxin wird aus Scenedesmus-Zellen - gezüchtet in batch-Kultur - durch konventionelle Verfahren isoliert und gereinigt. Eine grobe Abtrennung von labileren Proteinen erreicht man durch Säure- und Hitzebehandlung. Danach folgen Chromatographieschritte auf DEAE-Cellulose, Sephadex G-50 und CM-Cellulose. Man erhält nicht nur ein Protein, sondern - wie unten noch weiter ausgeführt - zwei Thioredoxine mit vergleichbarer spezifischer Aktivität (etwa 1400 Einheiten/mg) in 13 % Gesamtausbeute (Tab. 7). Die Identifizierung dieser beiden Proteine B I und B II als Thioredoxine beruht außer auf ihren Eigenschaften auf ihrer Funktion als Ribonucleotidreduktase-Substrat. Durch eine Ammoniumsulfatfällung (40-80 %) wird aus dem Rohextrakt eine hitzestabile Proteinfraktion isoliert, die sowohl die homologe pflanzliche als auch die bakterielle Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase stimuliert. Im endgültigen Reinigungsschema für Thioredoxin werden jedoch Säure- und Hitzefällung als erste Schritte durchgeführt und dabei Fraktionen erhalten, die nur vom E. coli-Enzym, nicht aber vom Algen-Enzym als Substrat akzeptiert werden. Im Hinblick auf die Schwierigkeiten bei der Reinigung und im Umgang mit der pflanzlichen Reduktase [91] ist zu vermuten, daß im Sediment der Ammoniumsulfatfällung mehrere Aktivitäten vorhanden waren, von denen jede alternativ mit einer anderen Ribonucleotidreduktase reagiert oder, was wahrscheinlicher ist, daß die pflanzliche Reduktase verschiedene Substanzen gemeinsam zur Funktionsfähigkeit benötigt. Es könnte sich dabei außer um Thioredoxin um eine Untereinheit des Enzyms handeln, die eine Säurebehandlung nicht übersteht. Damit wäre plausibel, warum die Algen-Ribonucleotidreduktase nicht mehr mit den gereinigten Algen-Thioredoxin-Fraktionen reagiert. Endgültigen Aufschluß kann nur die weitere Charakterisierung der Ribonucleotidreduktase bringen.

Nachdem Buchanan und Holmgren [24] einen lange bekannten Regulationsfaktor (ARP_b) der Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinat als Chloroplasten-Thioredoxin identifizieren konnten, ergab

sich die Frage, ob auch Scenedesmus als photosynthetisierender Organismus einen solchen Faktor enthält. Tatsächlich bewiesen Stichproben, daß Thioredoxin-Fraktionen nach der DEAE-Cellulose-Chromatographie sowohl die Ribonucleotidreduktase als auch die Bisphosphatase stimulieren. Die systematische Untersuchung brachte dann erstmals den Nachweis von zwei Thioredoxinen mit verschiedenen Hauptaktivitäten, Thioredoxin A und Thioredoxin B, im gleichen Organismus. Damit besitzt die Alge unerwarteterweise letztlich drei verschiedene Thioredoxinspecies. Während die Trennung der beiden Thioredoxine A und B auf DEAE-Cellulose nur andeutungsweise sichtbar wird, reicht der Unterschied der Molekülgrößen (A: 23 500, B: 12 600) aus, um beide Proteine durch Gelfiltration zu separieren.

Wenn man bei Experimenten auf Sephadex-Gelen mit einem Enzymtest zwei Aktivitätspeaks findet und die Molgewichte der zugehörigen Proteine die Annahme monomerer und dimerer Formen eines Moleküls zulassen - wie in diesem Fall -, dann liegt die Vermutung auf artifizielle Aggregationsprodukte nahe. Von E. coli- und Novikoff-Tumor-Thioredoxin sind solche Tendenzen zur oxidativen Dimerenbildung bekannt [7,9], die durch Reduktion der intermolekular gebildeten Disulfidbrücken rückgängig gemacht werden können. Dies war im Falle der beiden Thioredoxine A und B aus Scenedesmus nicht möglich. Während der gesamten Aufarbeitungsprozedur gelingt es niemals, mehrere Aktivitätspeaks im Elutionsdiagramm durch Behandlung der Proteine mit Dithiothreit auf einen einzigen zu reduzieren. Da alle Puffer Mercaptoethanol enthalten, wird die Bildung von Molekülaggregaten offenbar von vornherein unterdrückt, falls sie überhaupt möglich wäre.

Aus dem Vergleich der Aktivitäten der beiden Thioredoxin-Species wird deutlich (Abb. 4), daß keine absolute Spezifität bezüglich der Enzymreaktion vorliegt, allerdings wird die Ribonucleotidreduktase stärker als die Fructose-1,6-bisphosphatase von dem kleineren Thioredoxin B stimuliert, wohingegen das größere (Thioredoxin A) bevorzugt auf die Fructose-1,6-bisphosphatase wirkt. Prinzipiell besteht

jedoch eine vollständige Austauschbarkeit zwischen beiden Enzymen, die sogar noch auf eine weitere Reaktion ausgedehnt werden kann (s. 4.3). Wie oben erwähnt, läßt sich die vom Molgewicht her einheitliche Fraktion des Thioredoxin B in zwei weitere Komponenten - nach der Reihenfolge ihrer Elution von CM-Cellulose als Thioredoxin B I und Thioredoxin B II bezeichnet - auftrennen. Rechromatographie auf CM-Cellulose zeigt, daß beide Thioredoxine für sich stabil und unter den gegebenen Bedingungen nicht ineinander umwandelbar sind. Daneben unterscheiden sich sowohl die Spektren (Abb. 8), die isoelektrischen Punkte und das Laufverhalten auf Polyacrylamidgelen (3.2.4). Während Thioredoxin B I ein Absorptionsmaximum bei 276 nm hat, zeigt B II ein Maximum bei 280 nm und zusätzlich einen kleinen Peak bei 288 nm, wo B I nur eine Schulter aufweist. Thioredoxin B II läuft auf der Gelelektrophorese schneller als B I und hat einen stärker basischen isoelektrischen Punkt (5,4) als B I (5,2). Diese Befunde haben ihre Ursache in der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung der beiden Proteine (3.2.5; Tab. 11). Da Tryptophan nicht bestimmt werden konnte, ist ein Vergleich der Spektren mit dem Gehalt der Thioredoxine an UV-absorbierenden Aminosäuren leider nicht möglich. Dagegen läßt sich jedoch zeigen, daß verglichen mit B I fünf zusätzliche basische Aminosäuren in Thioredoxin B II für den höheren isoelektrischen Punkt und für die verzögerte Elution von CM-Cellulose verantwortlich sind und daß das stärker hydrophobe Thioredoxin B II entweder kompakter gebaut oder weniger hydratisiert ist als B I und daher auf dem Elektrophoresegel schneller wandert.

Aus zwei unabhängigen Analysen geht hervor, daß Thioredoxin B I wesentlich kleiner ist als B II (94 bzw. 112 Aminosäuren + ggf. Tryptophan-Reste). Dies steht im Widerspruch zur gelchromatographischen Molgewichtsbestimmung, die nur einen Wert von 12 600 für Thioredoxin B I und B II gemeinsam liefert. Die sukzessive Elution zweier Thioredoxine mit um etwa 2000 Dalton verschiedenen Molgewichten wäre bei der erreichten Genauigkeit der Trennung auf Sephadex G-75 deutlich geworden (Abb. 6).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Thioredoxine B I und B II zwei völlig verschiedene Proteine sind und eine gegenseitige (artifizielle) Umwandlung ausgeschlossen werden kann. Während E. coli-, Phagen- und Hefe-Thioredoxin nur je 2 Cysteinreste im Molekül tragen (Tab. 18), haben die Proteine aus Kalbsleber und Novikoff-Tumoren 4 bzw. 6. Wie die Aminosäureanalyse der Scenedesmus-Thioredoxine B I und B II zeigt, enthalten beide je 4 Cysteinreste. Verglichen damit liefert die kolorimetrische Titration der elektrolytisch reduzierten SH-Gruppen (s. 3.2.3) zu hohe Werte (etwa sechs Cysteinreste pro Molekül), was durch gemischte Disulfidbindungen zwischen Thioredoxin und Mercaptoethanol oder in der Unsicherheit bei der Bestimmung der Proteinkonzentration begründet sein kann. Erstaunlich ist der definitive Nachweis von vier Cysteinresten insofern, als reduziertes Thioredoxin nicht an Thiolsepharose bindet, obwohl vermutlich nur zwei aktive SH-Gruppen in so enger Nachbarschaft zueinander liegen, daß die Bindung der ersten Thiolgruppe des Thioredoxins zur Matrix von der zweiten reduktiv gespalten werden kann (vgl. 3.2.3). Freilich ist über Lokalisation und Reaktivität der zusätzlichen Cysteinreste weder hier noch im Kalbsleber-Thioredoxin etwas bekannt. Die Thioredoxine B I und B II stimmen in der Größe mit dem heterologen Molekül aus Hefe überein und stellen wahrscheinlich cytoplasmatische Thioredoxine dar. Sie lassen sich nicht an Glutathion und Glutathionreduktase zur Elektronenübertragung von NADPH auf die Ribonucleotidreduktase koppeln, besitzen folglich keine Glutaredoxinaktivität (3.4.1). Thioredoxin A ähnelt dem Chloroplasten-Faktor aus Spinat, ist aber mit 23 500 noch wesentlich schwerer als dieser. Die verglichen mit Thioredoxin B sehr geringe Menge an Thioredoxin A machte es leider unmöglich, auch dieses Material in vergleichbarer Weise zu charakterisieren. Seine spezifische Funktion und Lokalisation wird in 4.3 diskutiert.

Im Falle der Algen ist es gelungen, innerhalb eines Organismus drei verschiedene Thioredoxine nachzuweisen, die - wie beschrieben - zwischen drei Enzymsystemen austauschbar sind

Tab. 18 Charakteristik verschiedener Thioredoxine

Quelle	Molgewicht	Aminosäuren	Cysteinreste	Literatur
E. coli	11 657	108	2	1,56
T4-Phage	10 080	87	2	54
Lactobacillus leichmannii	nicht näher charakterisiert			3
Synechococcus 6301	11 500			87
Hefe Thioredoxin I	verschieden von II, aber nicht genauer beschrieben			55
Thioredoxin II	12 600	110	2	4,55
Scenedesmus				
Thioredoxin A	23 500			
Thioredoxin B I	12 600 [1]	94 [2]	4	
Thioredoxin B II	12 600	112	4	
Kalbsleber	12 000	103	4	7,21
Novikoff-Tumor	12 100	109	6	9
Rattenleber	nicht näher charakterisiert			8
Spinat	16 000 - 20 000			
				37,87

[1] nach Gelfiltration [2] nach Aminosäureanalyse

(vgl. auch 4.3). Auch aus Hefe ließen sich zwei Thioredoxine isolieren, die mit derselben homologen Thioredoxinreduktase reagieren und sich nicht in ihren Funktionen, wohl aber der Primärstruktur unterscheiden [4,55]. Es ist vermutet worden, daß es sich dabei um Varianten (Mutanten) desselben Proteins handelt, die in genetisch verschiedenen Hefestämmen als Ausgangsmaterial der Isolierung enthalten waren (A. Holmgren, persönliche Mitteilung). Im Lichte der bei Scenedesmus ebenfalls beobachteten Duplizität der Thioredoxine erscheint diese Annahme fraglich und die Existenz von Isoproteinen in den niederen Eukaryonten allgemein denkbar.

Alle Versuche in der Alge Scenedesmus obliquus eine NADPH- oder Ferredoxin-abhängige Thioredoxinreduktase nachzuweisen, brachten keinen direkten Erfolg. Einige Hinweise (Kap. 3.3) lassen jedoch den Schluß zu, daß in vitro die Wirkung einer Ferredoxin-abhängigen Thioredoxinreduktase beobachtet wurde. Es muß aber bemerkt werden, daß diese Experimente unter ungünstigen Bedingungen durchgeführt wurden, da die Elektronenübertragungskette von NADPH über Ferredoxin bis zum CDP vier Enzyme einschloß, von denen nur die zwei im Labor verfügbaren vorgegeben werden konnten (3.3.2). Neben der gesuchten Thioredoxinreduktase war noch ein viertes Enzym, die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase, deren Existenz in diesen Pflanzenextrakten nicht gesichert ist, notwendige Voraussetzung für die Funktion des Systems im erwarteten Sinne.

Eine NADPH-abhängige Thioredoxinreduktase konnte durch Bindung an 2',5'-ADP-Sepharose 4B, einem sehr spezifischen Affinitätsmaterial für NADP(H)-Enzyme, nicht nachgewiesen werden. Es gelang lediglich die Anreicherung von NADPH-abhängiger Glutathionreduktase. Daraus wird abgeleitet, daß eine NADPH-abhängige Thioredoxinreduktase in Algen ebensowenig vorkommt wie in Spinat [13]. In Pflanzen existiert - wenn man diese wenigen Befunde verallgemeinern darf - vermutlich nur der direkte Weg von Ferredoxin zum Thioredoxin über die entsprechende Thioredoxinreduktase, deren

Aktivität möglicherweise für die in vitro gemessene NADPH-abhängige CDP-Reduktion verantwortlich ist (3.3.1-2). Woher aber bezieht die Alge im Dunkeln unter heterotrophen Bedingungen ihre Reduktionsäquivalente zur Synthese von Desoxyribonucleotiden? Da ihr Nährmedium Glucose enthält, oxidiert sie Glucose-6-phosphat und bildet dabei NADPH. Auch in heterotroph gezüchteten Algen war keine NADPH-Thioredoxinreduktase auffindbar, deshalb muß ein anderer Weg des Wasserstofftransportes zwischen NADPH und Ribonucleotidreduktase durchlaufen werden, denn die direkte Reduktion von Nucleotiden durch NADPH an der Algen-Ribonucleotidreduktase ist nicht möglich [91]. In der Literatur gibt es ein Beispiel für ein ungewöhnliches Thioredoxin-System in dem photosynthetisierenden Organismus Euglena gracilis [11]. Die NADPH-Thioredoxinreduktase, identifiziert durch ein Spektrum, das FAD als prosthetische Gruppe anzeigt, hat ein Molekulargewicht von 185 000. "Protein I" (MG 240 000) mit Thioredoxin-ähnlicher Funktion besteht sogar aus mehreren Untereinheiten. Beide Komponenten stellen zusammen den Wasserstoff von NADPH für die Ribonucleotidreduktion zur Verfügung. Das Thioredoxinsystem scheint in diesem grünen Flagellaten weitaus komplexer zu sein als in anderen Organismen, doch fehlen hierzu neuere Ergebnisse.

Im Rückblick auf meine vorangegangenen Arbeiten mit Weizen- und Bohnenkeimlingen wird heute klar, warum eine NADPH-abhängige Reduktion von Disulfidbrücken in Pflanzenextrakten durch Kombination von höhermolekularen und kleineren Proteinen niemals eindeutig dokumentiert werden konnte [62]. Die gemessenen Effekte lassen sich nachträglich als Neben- oder Störreaktionen und Artefakte interpretieren. Sie beruhten möglicherweise auf der Anwesenheit von Glutathion und Glutathionreduktase oder noch eher der unspezifischen Proteindisulfid-Reduktase [42,43], obwohl alle Anstrengungen unternommen wurden, diese zu eliminieren. Es wird z. Zt. mit veränderter Nachweismethodik (amperometrische Titration von SH-Gruppen) geprüft, ob dieses Enzym heterologes Thioredoxin zu reduzieren vermag (G. Suske,

Staatsexamensarbeit, 1978). In diesem Fall könnte mit Hilfe der Proteindisulfidreduktase evtl. auch eine Thioredoxin-Fraktion der höheren Pflanzen mit Aussicht auf Erfolg gesucht werden, die prinzipiell zur Desoxyribonucleotidsynthese auch hier zu erwarten ist.

4.3 Multiple Funktionen von Thioredoxinen in Enzymsystemen

Über die Reinigung und Charakterisierung von pflanzlichen Thioredoxinen hinaus befaßt sich diese Arbeit mit den multiplen Funktionen und der Austauschbarkeit der Thioredoxine aus verschiedenen Organismen zwischen einer Reihe von Enzymsystemen. Wir untersuchten die prokaryotische Ribonucleotid-Reduktase aus E. coli (EC 1.17.4.1), die Fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) aus Chloroplasten der eukaryotischen Spinatpflanze und weiterhin die 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat-Sulfotransferase (EC 2.8.2-) aus Synechococcus 6301, einer Blaualge, die bezüglich ihrer metabolischen Fähigkeiten zwischen Bakterien und Pflanzen steht [99]. Wie schon die EC-Klassifizierung zeigt, handelt es sich um grundsätzlich verschiedene Aktivitäten, eine Oxidoreduktase, eine Transferase und eine Hydrolase. Unerwarteterweise wirken Thioredoxine auf alle diese Enzyme, indem sie die katalytische Funktion erst ermöglichen oder signifikant beschleunigen. Obwohl die Rolle von Thioredoxin und Thioredoxinreduktase bei der Reduktion von Methionin-Sulfoxid und "aktivem Sulfat" (PAPS) in Hefe schon lange bekannt ist [46], wurde nur in diesem einen Fall der Austausch des homologen gegen ein fremdes Thioredoxin (E. coli-) vorgenommen. Die Teilnahme von Thioredoxin an der Sulfatreduktion in E. coli wurde nur durch Vergleiche, nicht aber direkte Kreuzexperimente [48] belegt. Buchanan und Holmgren demonstrierten, daß ein Spinatfaktor, der die Fructose-1,6-bisphosphatase stimuliert, ebenso im E. coli-Ribonucleotidreduktase-Test aktiv ist [24], daß dieser Faktor am Chloroplasten-Enzym aber auch durch heterologe Substanzen aus anderen Organismen ersetzt werden kann. Die Thioredoxine

aus E. coli und Kaninchenleber werden von der Bisphosphatase akzeptiert, daneben auch nicht näher identifizierte Proteine aus photosynthetisierenden und nicht-photosynthetisierenden Organismen und Pflanzenteilen [93].

In dieser Arbeit werden systematische Experimente mit drei verschiedenen Thioredoxinen bzw. Faktoren beschrieben, die nach unterschiedlichen Kriterien präpariert worden sind. E. coli-Thioredoxin wurde als Substrat der Ribonucleotidreduktase, die beiden anderen aus Spinat und Synechococcus als Faktoren der Blaualgen-Sulfotransferase isoliert. Die zwei prokaryotischen Thioredoxine haben bei vergleichbaren Proteinkonzentrationen ähnliche Aktivitäten in der Sulfotransferase-katalysierten Übertragungsreaktion, gemessen an der [^{35}S]Sulfitfreisetzung. Auch der weniger reine Spinat-Faktor liefert annähernd gleiche Resultate (Tab. 17). Untersucht man die Stimulationswirkung dieser drei Thioredoxine auf E. coli-Ribonucleotidreduktase (Abb. 12), so bringt das homologe Protein erwartungsgemäß die höchsten Umsätze, während Spinat- und Blaualgen-Thioredoxin etwas schwächer stimulieren. (Diese Reaktionen identifizieren die Sulfotransferase-Faktoren erst als Thioredoxine.) Die K_M-Werte der einzelnen Thioredoxine spiegeln diese Verhältnisse wider: E. coli: $K_M = 0.5 \cdot 10^{-6}$ M; Synechococcus $K_M = 4 \cdot 10^{-6}$ M und Scenedesmus $K_M = 5 \cdot 10^{-6}$ M (vgl. Abb. 9). Die Affinität des Enzyms zum homologen ist also etwa zehnfach höher als zu einem heterologen Substrat. Weniger klar liegen die Verhältnisse im Vergleich der Kapazitäten, die Fructose-1,6-bisphosphatase zu aktivieren. Auch hier wirkt der homologe Faktor am besten, E. coli-Thioredoxin liefert mittlere Werte, aber Blaualgen-Thioredoxin zeigt nur geringfügige Stimulation, wenngleich diese sicher signifikant ist (Abb. 11). Ähnliche Versuche mit Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase aus heterotroph gewachsenen Scenedesmus-Algen, deren Thioredoxin-Stimulierung im Falle des Spinat-Enzyms [37] beschrieben wurde, scheiterten an der mangelhaften Methode der Enzympräparation [100], die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden konnte.

Die ubiquitäre Verbreitung von Thioredoxinen in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren ist heute gut dokumentiert. Ihr Aufbau ist im Prinzip ähnlich; die Unterschiede liegen in der Molekülgröße und der Aminosäurezusammensetzung. Die oben geschilderten Ergebnisse bekräftigen, zusammen mit den früher veröffentlichten Daten [13,24,40,48,93], daß diese Moleküle dank ihrer zwei exponierten Cysteinreste zu vielfältigen Funktionen befähigt sind.

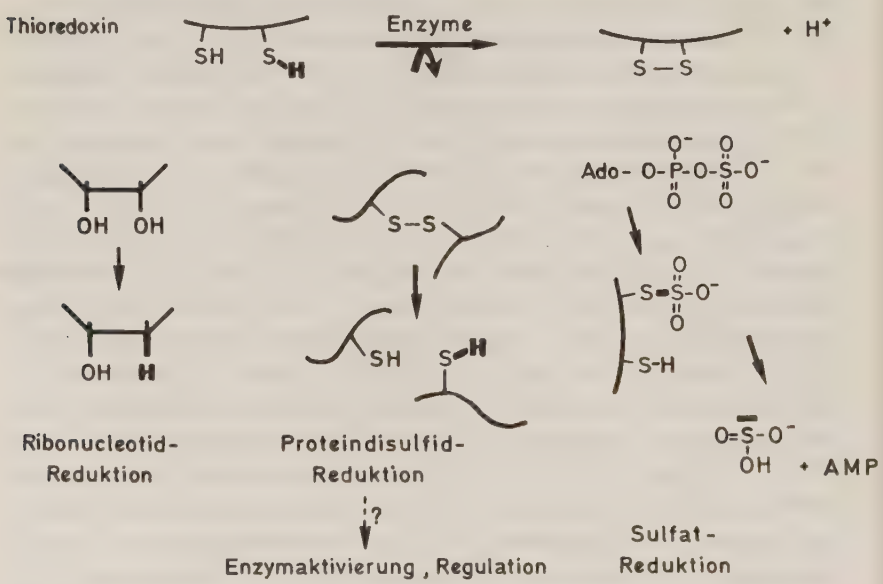


Abb. 13: Funktionen der Thioredoxine

Sie reagieren mit beiden Ribonucleotidreduktase-Typen, von denen die erste Nicht-Häm-Eisen enthält, die zweite aber Coenzym B_{12} zur Aktivität benötigt. In dieser Reaktion sind die Thioredoxine echte Substrate in der katalytischen Reduktion von Nucleosidphosphaten, wobei die von ihnen bereitgestellten Reduktionsäquivalente in stöchiometrischer Menge verbraucht werden [2].

Im Zusammenwirken mit der Sulfotransferase-Reaktion scheinen sie als Akzeptor des Sulfatrestes zu dienen, wenngleich ihre Rolle in der eigentlichen Reduktion des Schwefelatoms noch nicht restlos geklärt ist [48,51,87]. Zur Funktion als Akzeptor ist nur eine freie SH-Gruppe notwendig, trotzdem reagieren aber Monothiole nicht.

Die Thioredoxine aktivieren Enzyme wahrscheinlich durch Reduktion von Disulfidbrücken. Eine nachfolgende Umfaltung des Proteingerüstes kann für die Stimulation des katalysierten Umsatzes verantwortlich sein. Dieser Mechanismus trifft vermutlich auf die Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinat zu [12], deren Aminosäuresequenz zu 16 % aus Cystein (fast alle in Disulfidbrücken verknüpft), im Gegensatz zu 2 % beim Säugerenzym, besteht. Ob die Aktivierung der Malat-Dehydrogenase nur auf eine Reduktion von S-S-Bindungen zurückgeht, ist unsicher, da maximale Stimulation durch DTT nur in Gegenwart von Thioredoxin erreicht werden kann, wovon außerdem relativ große Mengen nötig sind [14]. Über die Stöchiometrie zwischen DTT-Verbrauch und Enzymaktivität, sowie über die Anzahl der notwendigen Thioredoxin-Moleküle pro aktivem Enzymmolekül existieren keine Angaben. Lediglich im Falle der NADPH-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase gibt es Anzeichen für die Bildung eines stabilen Thioredoxin-Enzym-Komplexes während der Aktivierung [13]. Eventuell lagert sich Thioredoxin als Untereinheit an das Enzym an, ähnlich wie das im Falle von E. coli-Thioredoxin und der DNA-Polymerase aus T7-Phagen bekannt ist [32].

Ob allein dieser Aktivierung, die physiologisch nur im Licht über reduziertes Ferredoxin und die Ferredoxin-abhängige Thioredoxinreduktase ablaufen kann, die Rolle der Licht-Dunkel-Regulation zukommt, ist noch nicht geklärt. Bemerkenswert ist jedoch, daß vor allem die Schlüsselenzyme an Stoffwechselverzweigungen von Thioredoxin stark beeinflußt werden.

Thioredoxine sind demnach in zahlreiche Reaktionen verwickelt und haben ihre Hauptfunktion nicht nur in der Ribonucleotidreduktion, wie lange angenommen wurde. Bei solchen multifunktionellen Proteinen muß man mit verschiedenen Affinitäten gegenüber den Thioredoxin-abhängigen Enzymen in homologen und erst recht in heterologen Systemen rechnen. Während die drei Thioredoxine im PAPS-Sulfotransferase- und im Ribonucleotidreduktase-Test sehr ähnliche Aktivitäten zeigen, differieren sie stark in der Reaktion mit Fructose-1,6-bisphosphatase. Das muß - je nach Einzelfall in unterschiedlichem Ausmaß - ihre verschiedenen Molekülgrößen und Strukturen, bzw. die davon abhängigen scheinbaren K_M-Werte widerspiegeln (s. o.).

Wir sind nun erstmals in der Lage, ein Muster für die Spezifität reduzierter und oxidierter Thioredoxine gegenüber Enzymsystemen zu erkennen, das die bisher wenig übersichtlichen Kreuzreaktionen mit einem gemeinsamen Konzept erklären läßt. Die gezeigte Austauschbarkeit reduzierter Thioredoxine zwischen Enzymen verschiedener Organismen scheint eine notwendige Konsequenz ihrer multiplen Funktionen innerhalb einer Zelle zu sein (vgl. Abb. 13 u. 14). Es ist vernünftig, anzunehmen, daß die Thioredoxin-abhängigen Enzyme nicht alle zugleich über eine strenge Spezifität gegenüber ihrem gemeinsamen Cofaktor verfügen können. Dazu wäre notwendig, daß sich in jedem dieser Enzyme große Domänen nahezu identischer Struktur als Bindungsstellen entwickelt und erhalten hätten (wie man sie für kleine Substrate oder Coenzyme kennt); aber das ist offenbar nicht der Fall.

Alle betrachteten Reaktionen (mit Ausnahme der T7-DNA-Polymerase) verwenden Thioredoxin in seiner reduzierten Form, denn eine Aktivität wird nur meßbar, wenn ein SH-regenerierendes System (DTT oder Thioredoxinreduktase) anwesend ist. Die einzigen Enzyme, die oxidiertes Thioredoxin binden und umsetzen, sind die NADPH- oder Ferredoxin-abhängigen Thioredoxinreduktasen, die weitestgehende Spezi-

Aktivität der Thioredoxine aus	gegenüber Ribonucleotidreduktase aus E.coli	L.leichm.	Hefe	Alge	Tumor	Leber	PAPS-Sulfotransferase aus Synechococcus	FbP-ase[1] aus Spinat	Thioredoxinreduktase aus E.coli	L.leichm.	Hefe	Spinat	Tumor	Leber
E.coli	●	●	●			●	●	●	●	+				+
L.leichmannii		●							-	●				
Synechococcus	●						●	●	-					
Hefe	●		●					●	-		●			+
Grünalge cytoplasm.	●			●			●	●	-					
Grünalge chloroplast.	●						●	●	-					
Spinat	●						●	●	-			●		-
Novikoff-Tumor	●				●				-				●	
Leber Ratte	●					●		●	-					●
Leber Kalb	●													●

● aktiv + wenig aktiv - inaktiv

[1] Fructose-1,6-bisphosphatase

Abb. 14 Aktivitität von Thioredoxinen in verschiedenen Enzymsystemen (Austauschbarkeit)

fität für ihr Substrat aufweisen (Abb. 14). Nur sehr selten reagieren diese Reduktasen mit heterologen Thioredoxinen. E. coli-Thioredoxinreduktase reduziert z. B. weder tierische, noch pflanzliche noch andere bakterielle Thioredoxine, während die E. coli-Ribonucleotidreduktase mit diesen Cosubstraten durchaus die Nucleosidphosphatreduktion katalysiert. Offensichtlich haben sich die Thioredoxinreduktasen auf ihr homologes Substrat spezialisiert mit dem einzigen Ziel, einen intrazellulären Spiegel dieses multifunktionellen Proteins in der reduzierten und damit aktiven Form aufrechtzuerhalten. Um diese These zu überprüfen, ist es nötig, einige weitere Thioredoxinreduktasen, insbesondere die im Detail völlig unbekannten Ferredoxinabhängigen Enzyme zu charakterisieren.

Wie diese Arbeit belegt, gelten die beschriebenen Beobachtungen auch genauso für die drei Thioredoxine aus Scenedesmus obliquus. Neben zwei kleinen Thioredoxinen, B I und B II, deren physikalische Eigenschaften (Spektrum, isoelektrischer Punkt) und Aminosäurezusammensetzung zwar verschieden, deren Funktionen aber nahezu identisch sind, tritt eine weitere Species (Thioredoxin A) auf, die durch ihr hohes Molgewicht (23 500) besonders auffällt. Es handelt sich hier (abgesehen vom Euglena-Protein) um den größten Vertreter der Thioredoxine, der bisher isoliert wurde. Im direkten Vergleich (Abb. 4) läßt sich demonstrieren, daß Thioredoxin A stärker mit der Fructose-1,6-bisphosphatase als mit der Ribonucleotidreduktase reagiert. Bei den Thioredoxinen B I und B II sind die Verhältnisse genau umgekehrt.

Im Sulfotransferase-Test sind alle drei Thioredoxine aktiv (Tab. 15 und 16), wirken jedoch verschieden stark stimulierend auf das Enzym.

4.4 Kompartimentierung von Thioredoxinen

Im Falle der Algen ist es gelungen, innerhalb eines Organismus drei verschiedene Thioredoxine nachzuweisen, die qualitativ zwischen den genannten Enzymen austauschbar, aber quantitativ betrachtet auf bestimmte Reaktionen spezialisiert sind.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß Thioredoxin A aus Scenedesmus im Molekulargewicht dem Regulationsprotein der Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinat ähnlich ist. Beide sind signifikant größer als die "normalen" Thioredoxine. Da das Spinat-Thioredoxin vermutlich am Ort seiner Wirksamkeit, in den Chloroplasten, lokalisiert ist [13] - wenn dies auch nur von einem Malatdehydrogenase-stimulierenden Faktor experimentell bewiesen wurde [96] - hat man auch in der (eukaryotischen) Grünalge Scenedesmus das große Thioredoxin wahrscheinlich in Chloroplasten zu suchen; die beiden kleinen im Cytoplasma. Für die cytoplasmatische Lokalisation der Thioredoxin-Hauptfraktionen B I und B II spricht auch, daß die Thioredoxine, die in der Ribonucleotidreduktase-Reaktion am stärksten wirksam sind, in dem

Zellkompartiment, in dem die Hauptmenge der DNA-Vorläufer synthetisiert wird, enthalten sein müssen. Bei der Frage, ob Thioredoxin A bei der chloroplastidären DNA-Synthese eine Rolle spielt, muß zuerst überprüft werden, ob eine - bislang noch hypothetische - chloroplasteneigene Ribonucleotidreduktase nachgewiesen werden kann.

Diese Fragen können beim hier beschriebenen Organismus nicht direkt durch Fraktionierung der Zellorganellen und Analyse der Inhaltsstoffe beantwortet werden, da bisher kein Verfahren zum Aufschluß der Zellwand von Scenedesmus bekannt ist, das nicht auch die Organellen schädigt. Umgekehrt wäre interessant, ob im Cytoplasma des Spinatblattes ein kleines Thioredoxin existiert, das besonders gut als Substrat der E. coli-Ribonucleotidreduktase fungiert. Buchanan fand in seinen Aufarbeitungen [94] zwar ein zweites Protein, das die Fructose-1,6-bisphosphatase nur schlecht stimuliert, aber weder mit der Ferredoxin-abhängigen Thioredoxinreduktase noch - wie unsere Tests ergaben - mit der E. coli-Ribonucleotidreduktase reagiert. Ein solcher Faktor, der ausschließlich auf die Fructose-1,6-bisphosphatase wirkt, läßt sich auch bei der Chromatographie von Algenextrakten bei hoher Ionenstärke von der DEAE-Cellulose eluieren (Abb. 3). Nach der ursprünglichen Definition (vgl. 1.1) kann es sich hierbei nicht um Thioredoxin handeln. Die Isolierung von Thioredoxin und Thioredoxinreduktase aus isolierten Chloroplasten - von Buchanan nicht systematisch ausgeführt - sollte Aufschluß über die Kompartimentierung von pflanzlichen Thioredoxinen geben können.

5. Zusammenfassung

Thioredoxine dienen bei der durch Ribonucleotidreduktase katalysierten Reduktion von Ribonucleotiden zu 2'-Desoxyribonucleotiden als Wasserstoffüberträger. In der einzelligen Grünalge Scenedesmus obliquus (Wildtyp D 3) haben wir drei verschiedene hitzestabile Proteine nachgewiesen, die in vitro mit dem heterologen Testenzym, Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase aus E. coli (EC 1.17.4.1) und Cytidindiphosphat als Substrat reagieren. Über konventionelle Reinigungsschritte konnten diese drei Thioredoxinspecies A, B I und B II voneinander getrennt werden. Während Thioredoxin B I und B II nach Gelchromatographie gleiches Molekulargewicht von 12 600 zeigen, ist Thioredoxin A mit 23 500 wesentlich schwerer. Die beiden kleinen, bis zur Homogenität gereinigten Thioredoxine sind durch identische enzymatische Funktion, aber unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung und physikalische Eigenschaften gekennzeichnet. Sie enthalten jeweils vier Cysteinreste im Molekül. Ihre starke Stimulation der Ribonucleotidreduktion und der Vergleich mit anderen Thioredoxinen machen eine Lokalisation im Cytoplasma wahrscheinlich. Die für Thioredoxine ungewöhnliche Größe und die ausgeprägte Aktivierung pflanzlicher Fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) zeigen dagegen Ähnlichkeit der Species A mit dem Thioredoxin aus Spinatblättern, so daß wir annehmen, hier ein chloroplastidäres Protein isoliert zu haben. Ein experimenteller Nachweis durch Präparation intakter Zellorganellen und Analyse ihrer Inhaltsstoffe ist allerdings bei dieser Alge nicht möglich. Während Thioredoxin A stärker die Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinat als die Ribonucleotidreduktase aus E. coli stimuliert, liegen die Verhältnisse bei den Thioredoxinen B I und B II umgekehrt. Alle drei Algen-Thioredoxine wirken schließlich bei der enzymatischen Sulfatreduktion in vitro als Akzeptor des von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat durch eine Sulfotransferase aus

Synechococcus 6301 (EC 2.8.2.-) übertragenen Sulfatrestes.

Der Nachweis von Thioredoxin-Aktivität der beschriebenen Proteine gegenüber der homologen Ribonucleotidreduktase aus Scenedesmus gelingt nur mit teilgereinigten, nicht aber homogenen Thioredoxin-Fraktionen. Die Ursache hierfür dürfte jedoch in Eigenschaften der noch ungenügend charakterisierten Algen-Ribonucleotidreduktase zu suchen sein. Da zur Austauschbarkeit der Thioredoxine verschiedener Organismen zwischen verschiedenen Enzymen bislang nur wenige quantitativ vergleichbare Kreuzexperimente vorliegen, werden im zweiten Teil der Arbeit systematische Untersuchungen dieser Art beschrieben. Thioredoxin aus E. coli wurde als Substrat der Ribonucleotidreduktase, die Proteine aus Spinat und Synechococcus als stimulierende "Faktoren" der Blaualgen-Sulfotransferase isoliert. Im Test mit der E. coli-Ribonucleotidreduktase bzw. der Sulfotransferase stimulieren alle drei Proteine in sehr ähnlichem Maße. Ihre Kapazitäten zur Aktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase zeigen größere Unterschiede.

Die Ergebnisse zusammengenommen demonstrieren eine prinzipielle Austauschbarkeit von Thioredoxinen zwischen unterschiedlichen Enzymsystemen. Als Konsequenz dieser multiplen Funktionen und der bekannten strukturellen Unterschiede der reduzierten Thioredoxine erwartet man verschiedene Affinitäten, nicht aber Spezifität der Enzyme gegenüber ihrem gemeinsamen Cofaktor. Damit im Einklang wird in den beschriebenen Kreuzexperimenten zwar höchste spezifische Aktivität oder niedrigster K_M-Wert in Thioredoxin/Enzym-Kombinationen gleicher Herkunft gefunden, doch die quantitativen Unterschiede zu heterologen Mischungen sind gering.

Nur eine Enzymreaktion ist dagegen mit oxidierten Thioredoxinen bekannt, und zwar die Reduktion durch Thioredoxinreduktasen (EC 1.6.4.5), die entweder von NADPH oder reduziertem Ferredoxin abhängig sind und (mit seltenen Ausnahmen)

nur das jeweils homologe Thioredoxin akzeptieren. Offensichtlich haben diese Enzyme die Spezifität für ein einziges Substrat mit dem Ziel entwickelt, einen intrazellulären Spiegel des vielfältig wirksamen Thioredoxins in der aktiven reduzierten Form aufrechtzuerhalten.

Der Nachweis einer NADPH-abhängigen Thioredoxinreduktase in Scenedesmus gelang nicht; einige experimentelle Befunde deuten auf Ferredoxin-abhängige Thioredoxinreduktase in der Alge hin.

Literaturverzeichnis

1. T. C. Laurent, E. C. Moore und P. Reichard, J. Biol. Chem. 239, 3436-3444 (1964)
2. H. Follmann, Angew. Chemie 86, 624-634 (1974)
3. M. D. Orr und E. Vitols, Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 109-115 (1966)
4. P. G. Porqué, A. Baldesten und P. Reichard, J. Biol. Chem. 245, 2363-2370 (1970)
5. O. Berglund, J. Biol. Chem. 244, 6306-6308 (1969)
6. S. Eriksson und O. Berglund, Eur. J. Biochem. 46, 271-278 (1974)
7. N.-E. Engström, A. Holmgren, A. Larsson und S. Söderhäll J. Biol. Chem. 249, 205-210 (1974)
8. G. Larson und A. Larsson, Eur. J. Biochem. 26, 119-124 (1972)
9. E. C. Herrmann und E. C. Moore, J. Biol. Chem. 248, 1219-1223 (1973)
10. F. K. Gleason und J. M. Wood, J. Bacteriol. 128, 673-676 (1976)
11. S. Munavalli, D. V. Parker und F. D. Hamilton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4233-4237 (1975)
12. B. B. Buchanan, P. Schürmann und P. P. Kalberer, J. Biol. Chem. 246, 5952-5959 (1971)
13. R. A. Wolosiuk und B. B. Buchanan, Nature 266, 565-567 (1977)
14. R. A. Wolosiuk, B. B. Buchanan und N. A. Crawford FEBS Letters 81, 253-258 (1977)
15. H. P. C. Hogenkamp und G. N. Sando, Struct. Bonding (Berlin) 20, 24-58 (1974) Springer Verlag
16. E. C. Moore, P. Reichard und L. Thelander, J. Biol. Chem. 239, 3445-3452 (1964)
17. L. Thelander, Biochem. Soc. Trans. 5, 606-610 (1977)
18. A. Larsson, Eur. J. Biochem. 35, 346-349 (1973)
19. G. Zanetti und C. H. Williams,Jr., J. Biol. Chem. 242, 5232-5236 (1967)
20. M. L. Speranza, S. Ronchi und L. Minchiotti, Biochim. Biophys. Acta 327, 274-281 (1973)

21. A. Holmgren, J. Biol. Chem. 252, 4600-4606 (1977)
22. C.-C. Chen, B. L. Borns McCall und E. C. Moore, Prep. Biochem. 7, 165-177 (1977)
23. O. Berglund und A. Holmgren, J. Biol. Chem. 250, 2778-2782 (1975)
24. A. Holmgren, B. B. Buchanan und R. A. Wolosiuk, FEBS Letters 82, 351-354 (1977)
25. P. Reichard, A. Baldesten und L. Rutberg, J. Biol. Chem. 236, 1150-1157 (1961)
26. B.-M. Sjöberg, P. Reichard, A. Gräslund und A. Ehrenberg, J. Biol. Chem. 252, 536-541 (1977)
27. S. Eriksson, B.-M. Sjöberg, S. Hahne und O. Karlström, J. Biol. Chem. 252, 6132-6138 (1977)
28. N. C. Brown und P. Reichard, J. Mol. Biol. 46, 25-38 (1969)
29. N. C. Brown und P. Reichard, J. Mol. Biol. 46, 39-55 (1969)
30. R. L. Blakley und H. A. Barker, Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 391-397 (1964)
31. W. Ludwig und H. Follmann, Eur. J. Biochem. 82, 393-403, (1978)
32. D. F. Mark und C. C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 780-784 (1976)
33. A. Holmgren, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2275-2279 (1976)
34. J. Fuchs, J. Bacteriol. 129, 967-972 (1977)
35. J. A. Fuchs und H. R. Warner, J. Bacteriol. 124, 140-148 (1975)
36. A. R. Portis, Jr., C. J. Chon, A. Mosbach und H. W. Heldt Biochim. Biophys. Acta 461, 313-325 (1977)
37. P. Schürmann, R. A. Wolosiuk, V. D. Breazeale und B. B. Buchanan, Nature 263, 257-258 (1976)
38. J. Barber und B. Halliwell, Nature 270, 104-105 (1977)
39. P. Schürmann und B. B. Buchanan, Biochim. Biophys. Acta 376, 189-192 (1975)
40. P. Maness und A. Orengo, Biochim. Biophys. Acta 429, 182-190 (1976)
41. S. Kobayashi und K. Kanayama, Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 1249-1255 (1977)
42. M. D. Hatch und J. F. Turner, Biochem. J. 76, 556-562 (1960)
43. T. V. Gorpinchenko, A. B. Vakar und V. L. Kretovich, Biochemistry (Übersetzung von Biokhimiya) 40, 269-275 (1975)

44. F.Tietze, Biochim. Biophys. Acta 220, 449-462 (1970)
45. A. Holmgren und F. J. Morgan, Eur. J. Biochem. 70, 377-383 (1976)
46. P. G. Porqué, A. Baldesten und P. Reichard, J. Biol. Chem. 245, 2371-2374 (1970)
47. L. G. Wilson und D. Bierer, Biochem. J. 158, 255-270 (1976)
48. M. L.-S. Tsang und J. A. Schiff, J. Bacteriol. 125, 923-933 (1976)
49. A. Schmidt, Plant Sci. Lett. 5, 407-415 (1975)
50. M. L.-S. Tsang und J. A. Schiff, Eur. J. Biochem. 65, 113-121 (1976)
51. A. Schmidt, FEMS Microbiol. Lett. 1, 137-140 (1977)
52. A. Schmidt, W. R. Abrams und J. A. Schiff, Eur. J. Biochem. 47, 423-434 (1974)
53. A. Schmidt, Planta (Berl.) 130, 257-263 (1976)
54. B.-M. Sjöberg und A. Holmgren, J. Biol. Chem. 247, 8063-8068 (1972)
55. D. E. Hall, A. Baldesten, A. Holmgren und P. Reichard, Eur. J. Biochem. 23, 328-335 (1971)
56. A. Holmgren, Eur. J. Biochem. 6, 475-484 (1968)
57. A. Holmgren, B.-O. Söderberg, H. Eklund und C.-I. Brändén, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2305-2309 (1975)
58. I. Slaby und A. Holmgren, J. Biol. Chem. 250, 1340-1347 (1975)
59. H. Müller, R. Wahl, I. Kuntz und H. Follmann, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1299-1307 (1973)
60. W. Feller und H. Follmann, Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 752-758 (1976)
61. B. Hovemann und H. Follmann, Anal. Biochem. 79, 119-128 (1977)
62. W. Wagner, Diplomarbeit, Marburg 1975
63. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und F. J. Randall, J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
64. N. I. Bishop, H. Senger, Methods Enzymol. XXIII A, 53-66 (1971)
65. W. A. Kratz, J. Myers, Amer. J. Bot. 42, 282-287 (1955)

66. J. Pfau, K. Werthmüller und H. Senger, Arch. Microbiol. 75, 338-345 (1971)
67. L. H. Pratt, N. I. Bishop, Biochim. Biophys. Acta 153, 664-674 (1968)
68. H. Senger und V. Mell, Methods Cell Biol. XV, 201-218 Acad. Press, New York (1977)
69. I. Bratt, A.Holmgren und M. Luthman, pers. Mitteilung
70. V. P. Pigiet und R. C. Conley, J. Biol. Chem. 252, 6367-6372 (1977)
71. G. L. Ellman, Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77 (1959)
72. N. C. Brown, Z. N. Canellakis, B. Lundin, P. Reichard und L. Thelander, Eur. J. Biochem. 9, 561-573 (1969)
73. K. Randerath und E. Randerath, J. Chromatog. 16, 111-125 (1964)
74. E. Randerath und K. Randerath, J. Chromatog. 16, 126-129 (1964)
75. A. W. Schrecker, D. W. Jacobsen und J. Kirchner, Anal. Biochem. 26, 474-477 (1968)
76. A. Schmidt, Planta (Berl.) 124, 267-275 (1975)
77. P. D. J. Weitzman, Anal.Biochem. 76, 170-176 (1976)
78. K. Brocklehurst, J. Carlsson, M. P. J. Kierstan und E. M. Crook, Biochem. J. 133, 573-584 (1973)
79. Cytochromes; R. Lemberg und J. Barrett, Academic Press London and New York, 1973, S. 202 ff.
80. K. Tagawa und D. I. Arnon, Nature 195, 537-543 (1962)
81. P. Rauschenbach, H.-L. Schmidt, H. Simon (Hrsg.) R. Tykva und M. Wenzel in: Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen, S. 53-76, Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York 1974
82. P. Andrews, Biochem. J. 96, 595-606 (1965)
83. R. M. Silverstein, Anal. Biochem. 63, 281-282 (1975)
84. A. J. Parker und N. Kharasch, Chem. Rev. 59, 583-628 (1959)
85. M. Shim, K. Tagawa und D. I. Arnon, Biochem. Z. 338, 84-96 (1963)
86. D. Hoffmann, R. Thauer und A. Trebst, Z. Naturforsch. 32c, 257-262 (1977)
87. A. Schmidt und U. Christen, Planta (1978) im Druck

88. H. R. Maurer in: Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis Walter de Gruyter-Verlag, Berlin - New York 1971 2. Auflage
89. Z. L. Awdeh. A. R. Williamson und B. A. Askonas, Nature 219, 66-67 (1968)
90. J. A. Fuchs, J. Bacteriol. 130, 957-959 (1977)
91. W. Feller, Dissertation in Vorbereitung, Fb Chemie, Marburg
92. A. Larsson und P. Reichard, J. Biol. Chem. 241, 2533-2539 (1966)
93. B. B. Buchanan und R. A. Wolosiuk, Nature 264, 669-670 (1976)
94. R. A. Wolosiuk, P. Schürmann und B. B. Buchanan, Methods Enzymol., in Vorbereitung
95. G. Schimpff, H. Müller und H. Follmann, Biochim. Biophys. Acta (1978), im Druck
96. J. P. Jacquot, J. Vidal und P. Gadal, Planta 137, 89-90 (1977)
97. G. H. Barlow und E. Margoliash, J. Biol. Chem. 241, 1473-1477 (1966)
98. C. H. W. Hirs, J. Biol. Chem. 219, 611-621 (1956)
99. C. P. Wolk, Bacteriol. Rev. 37, 32-101 (1973)
100. M. J. O'Brien und R. Powls, Eur. J. Biochem. 63, 155-161 (1976)

Mein besonderer Dank gilt den im Text genannten Damen und Herren für die freundliche Unterstützung dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. H. Follmann, dessen Diskussionsbereitschaft und aufmunternder Optimismus für den Fortgang der Untersuchungen - besonders in langen Phasen des Mißerfolges - von wesentlicher Bedeutung waren.

Lebenslauf

1. Juli 1949	Geburt als Sohn des Erhard Wagner und seiner Frau Elisabeth, geb. Köllner, in Fulda
1956	Eintritt in die Heinrich-von-Bibra-Schule in Fulda
1960	Wechsel zum Freiherr-vom-Stein-Gymnasium (naturwissenschaftlicher Zweig)
20. Juni 1968	Abitur
Juli 1968 - Oktober 1969	Militärdienst bei der Bundeswehr in Rotenburg/Fulda
Oktober 1969 - März 1972	Studium der Chemie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
20. Februar 1972	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
April 1972	Wechsel zur Philipps-Universität in Marburg
29. März 1974	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
1974-1975	Anfertigung der Diplomarbeit unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Follmann im Fachgebiet Biochemie: "Untersuchungen über ein Thioredoxin-System in Pflanzen"
22. April 1975	Abschluß als Diplom-Chemiker
Mai 1975 - April 1978	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Follmann

Seit Mai 1974 verheiratet mit Claudia Littwinsky